

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝZNAM PROBIOTIK V DĚTSKÉ VÝŽIVĚ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KAMILA AUGUSTOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝZNAM PROBIOTIK V DĚTSKÉ VÝŽIVĚ

IMPORTANCE OF PROBIOTICS IN CHILD'S NUTRITION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KAMILA AUGUSTOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0337/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Kamila Augustová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí bakalářské práce:	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Význam probiotik v dětské výživě

Zadání bakalářské práce:

1. Literární přehled na zadané téma
2. Vztah mezi dětskou výživou a probiotiky
3. Přehledné zpracování získaných informací a jejich souhrnné hodnocení

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kamila Augustová
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Díky velkému pokroku ve vědě, medicíně a poznání člověk dosáhl v léčení vysoké úrovně. Nicméně, i v dnešní době se lidstvo snaží o návrat ke svým kořenům – přírodě a využít ji pro udržení svého pevného zdraví. Pojem probiotika se myslí živé mikroorganismy, které jsou schopny usídlit se v lidském střevě a mít zde kladný vliv na udržení zdravé střevní mikroflóry, což se dále promítne pozitivními účinky na lidské zdraví obecně. Firma Valosun a.s. poskytla pro testování probiotický potravní doplněk pro děti, který byl vyzkoušen matkami s dětmi předškolního věku a těhotnými. Cílem našeho sociologického průzkumu, bylo zjistit, jaká je informovanost o problematice probiotik v této skupině, dále jak vnímají dotazované dostupnost probiotik a jaké jsou nejčastější důvody pro jejich užívání.

ABSTRACT

With great advances in science, medicine and knowledge of a man at the high level of treatment. However, even today the humanity seeking to return to its roots - the nature and use it to maintain its good health. The term probiotics is meant by living organisms that are capable of resettling in the human intestine and have a positive impact on maintaining healthy intestinal microorganisms, which also reflected the positive effects on human health in general. Company Valosun a.s. provided for testing probiotický food supplement for children, which was tested mothers with children preschool age and pregnant. The aim of our sociological survey was to determine what is the awareness of the issue of probiotics in this group, the perception of the queried the availability of probiotics and what are the most common reasons for their use.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, zažívací trakt lidí, střevní mikroflóra, bakterie mléčného kvašení, dětská onemocnění

KEYWORDS

Probiotics, digestive tract of humans, intestinal microflora, bacteria fermentation of milk, children's diseases

AUGUSTOVÁ, K. *Význam probiotik v dětské výživě*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 57 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Mgr. Daně Vránové za odborné vedení, pomoc a ochotu při realizaci bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat firmě Valosun a.s. za poskytnutí přípravku Biopron JUNIOR.

OBSAH

1	Úvod.....	6
2	Teoretická část.....	7
2.1	Probiotika	7
2.1.1	Obecná charakteristika	7
2.2	Trávicí trakt a bakterie trávicího traktu.....	8
2.3	Mikrobiální kultury používané jako probiotika	11
2.3.1	Rod <i>Streptococcus</i>	12
2.3.2	Mléčná skupina - rod <i>Lactococcus</i>	13
2.3.3	Enterokoková skupina - rod <i>Enterococcus</i>	14
2.3.4	Rod <i>Lactobacillus</i>	15
2.3.5	Rod <i>Bifidobacterium</i>	17
2.4	Mechanismus účinku probiotik	18
2.5	Výživa dětí od narození.....	21
2.6	Probiotika a jejich vliv na zdraví.....	22
2.7	Průzkum trhu s probiotiky pro děti	28
3	Praktická část.....	30
3.1	Zpracování dotazníkové studie zaměřující se na doplňky stravy pro děti obsahující probiotika	30
3.2	Výsledky a diskuze.....	30
3.3	Kultivace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> ze zakoupených probiotických preparátů	44
3.3.1	Výsledky a diskuze.....	45
4	Závěr.....	51
5	Literatura	52
6	Seznam zkratk	56
7	Seznam příloh.....	57

1 ÚVOD

Celý vývoj člověka doprovází nejen snaha se rozvíjet, ale být také zdravým jedincem. Předchozí prohlášení nás tedy nabádá k zamyšlení, co je zdraví? Nejčastější a nejobecnější definice jej popisuje jako stav kompletní fyzické, mentální a sociální pohody. Díky velkému pokroku ve vědě, medicíně a poznání celkově člověk dosáhl v léčení vysoké úrovně. Nicméně, i v dnešní době se lidstvo snaží o návrat ke svým kořenům – přírodě a využít ji pro udržení svého pevného zdraví.

Takovým příkladem může být i narůstající využití probiotických kultur jako doplňku stravy. Pojem probiotika se myslí živé mikroorganismy, které jsou schopny usídlit se v lidském střevě a mít zde kladný vliv na udržení zdravé střevní mikrofóry, což se dále promítne pozitivními účinky na lidské zdraví obecně. Přestože užívání probiotik je na vzestupu, stále je toto téma spíše ve středu zájmu z řad odborníků a vědců, než mezi laickou veřejností. A právě proto by měly být v daleko větší míře mezi širokou veřejnost propagovány a jejich účinky vysvětlovány.

Dnes se již nachází na trhu velká škála probiotických doplňků stravy a je možné si mezi jednotlivými probiotiky vybírat jak v lékárnách (doplňky stravy), tak i ve zcela běžných obchodech s potravinami (běžná potravina). Ale jak si správně vybrat? Největší vliv na výběr jakéhokoli zboží dostupného na trhu má ve třetím tisíciletí reklama a cena produktu. U prostředků, kterými chceme udržet či zlepšit svůj zdravotní stav, by reklama nebo cena zásadní roli hrát neměla. Hlavním kritériem by měla být kvalita a prospěšnost pro lidský organismus.

Firma Valosun a.s. poskytla pro testování probiotický potravní doplněk pro děti, který byl vyzkoušen matkami s dětmi předškolního věku a těhotnými. Dotazovaným ženám byl rozdán dotazník. Cílem našeho sociologického průzkumu, bylo zjistit, jaká je informovanost o problematice probiotik v této skupině, dále jak vnímají dotazované dostupnost probiotik a jaké jsou nejčastější důvody pro jejich užívání. V neposlední řadě nás zajímal zájem a názor na probiotika určená dětem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

2.1.1 Obecná charakteristika

První definice probiotik byla publikována v roce 1953 a probiotika popisovala jako látky běžně obsažené ve vegetariánském jídle, např. vitaminy, aromatické látky, enzymy a případně jiné látky spojené s procesy nezbytnými pro život. Definice z roku 2001 probiotika popisuje už přesněji a výstižněji. Probiotikum je přípravek nebo výrobek obsahující životaschopné mikroorganismy definované v dostatečném množství, které změní mikroflóru v určitém místě hostitele a tím vyvinou prospěšný účinek na jeho zdraví [1, 2]. V důsledku široké škály rodů a druhů bakterií, které by mohly být potencionálně považovány za probiotika, je nutné uvést, že za prokázané a komerčně nejdůležitější probiotika jsou všeobecně považovány bakterie mléčného kvašení (LAB).

Na bakterie, které mají být použity jako probiotika jsou kladeny vysoké nároky. Aby splňovaly svou roli při pozitivním účinku na zdraví musí splňovat řadu podmínek (Tab. 1). Prvním krokem při výběru vhodného probiotického kmene je určení přesného taxonomického zařazení bakterie, jenž poskytne informace o původu, místě výskytu a fyziologii. Klasifikace a příbuznost probiotik (a jiných mikroorganismů) je založena na srovnání konzervativních úseků molekul DNA, a to konkrétně těch úseků, které slouží ke kódování genů kódujících ribozomální RNA (rRNA). Významné pokroky v molekulárních biologických metodách umožnily sekvenování 16S/23S rRNA sekvencí a tím vytvoření velkých sekvenčních databází, které mohou usnadnit rychlé a přesné zařazení požadovaných probiotických kmenů [1].

Místem účinku probiotik je tenké a tlusté střevo hostitele. Gastrointestinální ekosystém tvoří nejen mikroorganismy střevního epitelu ale také slizniční imunitní systém a tyto složky tvoří základ pro všechny funkce a správný vývoj vyztřělého systému.

Pro celkovou životaschopnost střevní mikroflóry je potřebné, aby ve střevě byl zdroj živin. Nutriční substrát pro probiotika nazýváme prebiotika, jde o různé oligosacharidy a vlákninu. Prebiotika nejsou štěpitelná enzymy lidského střeva, ale jsou potencionálním substrátem pro mikroorganismy obývající trávicí trakt. Tím se probiotika stávají nepostradatelné pro metabolické a funkční aktivity střevní sliznice.

Třetí skupinou související s bakteriemi tvořícími střevní mikroflóru jsou symbiotika, ty můžeme charakterizovat jako různé směsi probiotik s prebiotik, které mají za úkol utvářet střevní mikroflóru ve prospěch hostitele [3, 4].

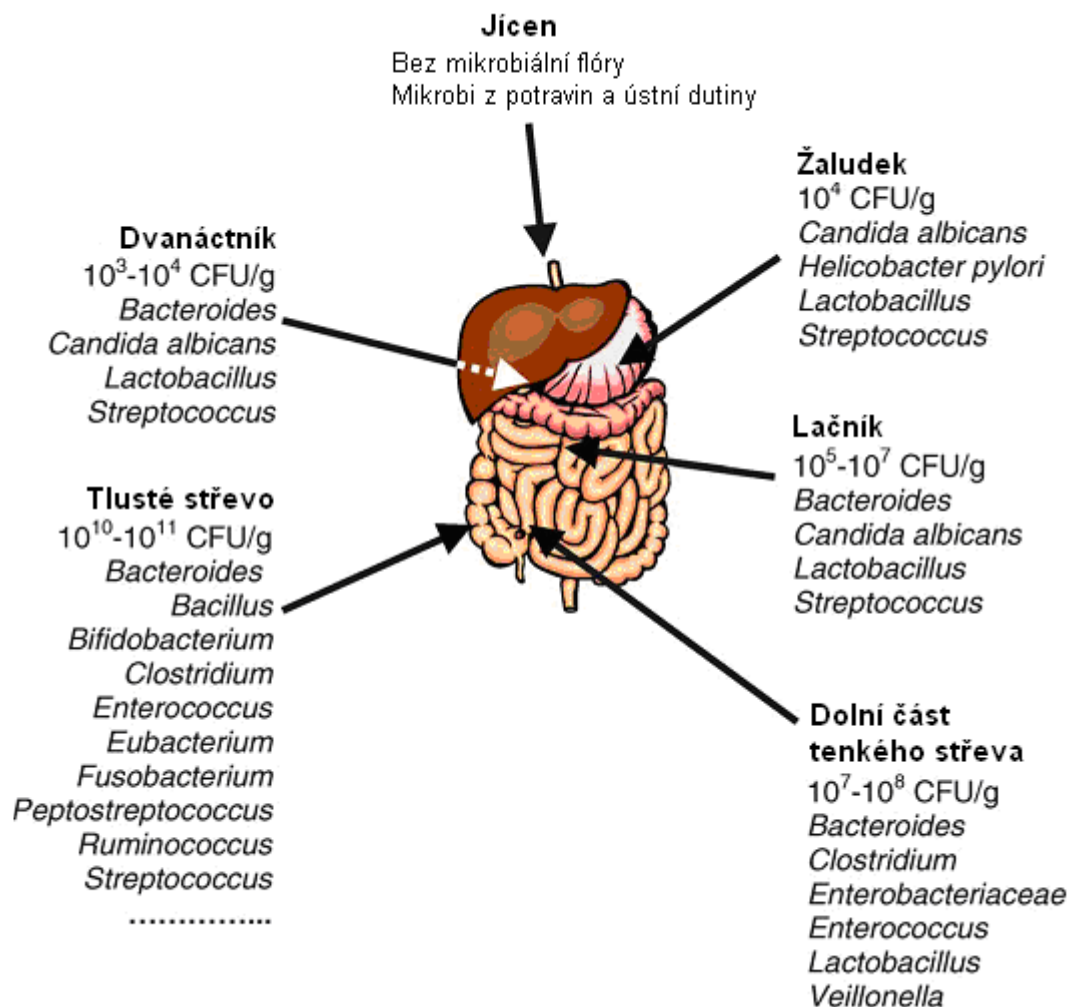
Tab. 1: Požadavky na probiotické druhy a kmeny bakterií [1]

Obecně	Vlastnosti
<i>Bezpečnostní kritéria</i>	původ
	patogenita a infekčnost
	virulenční faktory - toxické, metabolické aktivity a vlastností, tj. antibiotické rezistence
<i>Technologické kritéria</i>	geneticky stabilní kmeny
	požadovaná životnost během zpracování a skladování
	dobré senzorické vlastnosti
	fágová rezistence
	velký rozsah výroby
<i>Funkční kritéria</i>	tolerance k žaludečním kyselinám a šťávám
	tolerance vůči žluči
	přilnavost k povrchu sliznice
	validované a zdokumentované účinky na zdraví
<i>Žádoucí fyziologické kritéria</i>	úprava imunity (imunomodulace)
	nepřátelské aktivity směrem k gastrointestinálním patogenům
	cholesterolový metabolismus
	laktózový metabolismus
	antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti

2.2 Trávicí trakt a bakterie trávicího traktu

Trávicí trakt představuje jeden z nejsložitějších ekosystémů. Povrch sliznice poskytuje velký prostor pro přilnutí a osídlení mikroorganismy. Ve srovnání s povrchem kůže, který je odhadován na 2 m², je vnitřní povrch gastrointestinálního systému obrovský. Jeho velikost se pohybuje mezi 150 až 200 m². Trojnásobné zvýšení dostupné plochy střeva vznikne vytvořením záhybů, 7 – 10násobný nárůst plochy je dán tvorbou klků ve střevech a největší podíl na nárůstu aktivní plochy (15-40krát) mají mikrokly. Tím je zajištěn nutný prostor pro trávení, přilnutí ke slizničnímu povrchu a také ke kolonizaci střev.

Přes rychlý pokrok ve výzkumu střevní mikrobiální ekologie je naše chápání tohoto komplexního ekosystému a mikrobiálních interakcí omezené. V GIT průměrného dospělého člověka se nachází 10¹⁴ mikrobiálních buněk, tedy asi 10krát více než všech tkáňových buněk těla dohromady. Tento obrovský metabolický potenciál naznačuje silný regulační účinek na tělesné funkce, zejména v tlustém střevě, kde byla nalezena největší koncentrace bakteriálních buněk, uvádí se až 5 · 10¹¹ CFU/g. Mezi zástupce těchto více než 400 druhů autochtonních mikroorganismů patří různorodé bakterie. Ke grampozitivním anaerobním rodům zařazujeme *Eubacterium* a *Bifidobacterium*, tyto bakterie převládají ve mikroflóře tlustého střeva. Jiné rody jako *Clostridia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* a *Lactobacillus* hrají důležitou roli při udržování stabilní střevní sliznice a při vytváření prospěšného množství krátkých řetězců mastných kyselin [5, 2].



Obr.1: Početně dominantní mikrobiální rody zastoupené v trávicím traktu dospělého člověka [9]

Ve střevech také můžeme pozorovat postupnou proměnu mikrobiálního ekosystému od převahy aerobů v orální části střev k převaze anaerobů v jejich aborálních oddílech. Jejich významný poměr ukazuje Tab. 2. Postupný přechod dominance aerobů v orálních úsecích trávicí trubice k převaze anaerobů v distálním kolonu představuje základní funkčně strukturní změnu. Aeroby totiž pro celý mikroekosystém zajišťují *scavenger effect* (zhášecí efekt pro vznik volných radikálů) tím, že s dominancí *E. coli* spotřebovávají kyslík v reakcích oxidativní fosforylace při energetickém metabolismu. Tím klesá směrem dál do tlustého střeva redoxpotenciál, což umožňuje růst anaerobů, které jsou jinak citlivé na přítomnost kyslíku, protože nejsou dostatečně vybaveny enzymy k eliminaci kyslíkových radikálů (kataláza, superoxiddismutáza aj.). Takto je zajištěna vzájemná podmíněnost existence obou skupin mikroorganismů, neboť je zřejmé, že poškození aerobů vede následně k postižení anaerobní skupiny [6].

Tab. 2: Výskyt anaerobů a aerobů vzhledem k místu výskytu [6]

oddíl GIT	anaeroby : aeroby
tenké střevo	1 : 1
počátek tlustého střeva	100 : 1
konec tlustého střeva	1000 : 1

Přestože se zdá fekální flóra jako vhodným kvalitativním indikátorem distální mikroflóry tlustého střeva, určitě neodráží mikroflóru tenkého střeva jako celku. Z toho je patrné, že střevní osídlení se mění segment od segmentu, kromě toho je také střevní prostředí určováno dalšími faktory jako např. strava, genetické pozadí a fyziologický stav hostitele. Stabilita v druhovém složení může být charakteristickým znakem „normální“ střevní mikroflóry hostitele, zatímco zastoupení bakteriálních kmenů uvnitř populace může být méně stabilní. Dřívější pozorování bylo založeno na datech získaných z kultivačních procesů a nebyly vzaty v úvahu bakterie, které nebylo možno kultivovat a které přitom mohou zahrnovat důležité skupiny mikroorganismů, u nichž zatím nejsou přesně známy kultivační podmínky a podmínky pro růst nebo jsou v latentním stavu. Pomocí genetických metod bylo zjištěno, že zastoupení rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* je pro každého člověka unikátní. Dále bylo prokázáno, že zastoupení těchto rodů v trávicím traktu člověka může být pro některé jedince relativně konstantní a pro jiné se tato hodnota ukázala jako značně kolísavá.

Klíčová role prospěšných mikroorganismů v GIT pro lidské zdraví byla dlouho opomíjena a pozornost se soustředila především na střevní patogeny a faktory vedoucí k gastrointestinálním onemocněním. Zdravý střevní epitel a optimální střevní mikroflóra představuje zásadní bariéru proti invazi nebo šíření patogenních mikroorganismů, antigenů a škodlivých látek ve střevech. Také střevní sliznice efektivně vstřebává antigeny, zatímco specifické imunitní odpovědi jsou vyvolány specializovaným antigenním transportním mechanismem v epitelu klků a Peyerovými pláty. Stabilní mikrobiální bariéra, typická pro zdravé jedince, zajišťuje hostiteli ochranu a podporu pro normální střevní funkce a imunologickou rezistenci. V tenkém střevě bylo nalezeno přibližně 80 % (10^{10}) z celkového počtu buněk produkujících imunoglobuliny, zatímco střevní mikroflóra jako taková je základ pro slizniční imunitní stimulaci a amplifikaci imunokompetitivních buněk. Hlavní fyziologické funkce střevní mikroflóry jsou následující:

- funkce bariéry
- stimulace imunitního systému
- zajištění výživy sliznice a jejího oběhu
- produkce živin a zlepšení biologické dostupnosti
- stimulace pohybů střev [5, 2]

V předchozích bodech jsou vystihnuty nejdůležitější fyziologické funkce mikroflóry. Zbývá tedy definovat pojem kolonizační rezistence. Jedná se o rezistenci aerobů a anaerobů gastrointestinálního traktu vůči patogenům (salmonely, shigely, yersiny, campylobakter, vibria atd.) a potenciálním patogenům (helikobakter, klostridia, kandidy atd.). Jejich součástí je také kontrola oportunní mikroflóry (proteus, pseudomonády, enterobakterie, stafylokoky, streptokoky, sulfbakterie atd.). Kolonizační rezistenci definoval *van der Waaij*. Je zajišťována následujícími mechanismy:

- obsazení potenciálních vazebných míst střevní výstelky – tzv. receptorová blokáce
- brzdění růstu a/nebo usmrcení cizích mikroorganismů
- konkurence v získávání látek, vitamínů a růstových faktorů
- snížení střevního pH

- přímý antagonismus fyziologické mikroflóry vůči mikroflóře patogenní a potenciálně patogenní [6]

Patogenní infekce trávicího traktu představují kolonizaci trávicího traktu takovými mikroorganismy, které za fyziologických okolností nepřestoupí určitou kvantitativní hranici (nejčastěji nejsou vůbec přítomny) a které svým metabolismem a jeho produkty mohou makroorganismus poškozovat a vyvolávat příznaky infekčních nemocí. Patří sem bakterie, viry, kvasinkové a plísňové mikroorganismy a prvoci. Mírou patogenity mikroorganismů pro makroorganismus je virulence, což je souhrn invazivity a toxigenity. Invazivitu můžeme definovat jako schopnost mikroorganismu proniknout do tkáně makroorganismu a množením a metabolickými aktivitami ji poškozovat. Toxigenita je schopnost mikroorganismu produkovat látky, které působí toxicky na okolí. Toxiny produkují mikroorganismy ještě živé (exotoxiny), nebo se uvolňují z jejich těl až po jejich zániku (endotoxiny). Virulence mikroorganismu je dána nejen jeho vlastnostmi, ale také jeho stavem. Z tohoto hlediska rozlišujeme primární patogeny, které způsobují onemocnění zdravého organismu a oportunní – podmíněné patogeny, které mohou vyvolat onemocnění organismu pouze za určitých podmínek, zejména u imunitně oslabených jedinců. Pak hovoříme o primárních patogenních infekcích a oportunních infekcích. Oportunní infekce trávicího traktu vznikají dvojím způsobem. V prvním případě menšinové složky fyziologické mikroflóry (např. kandidy, klostridie, stafylokoky apod.), jejichž množství je za fyziologických okolností kontrolováno dominantními mikroorganismy, přerůstají, a jejich nadnormální množství spouští nežádoucí reakce organismu. Ve druhém případě se zdrojem oportunní infekce mohou stát exogenní mikroorganismy, které nejsou součástí vlastní mikroflóry (např. *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*). Vlastní proces infekce zahrnuje tři stupně:

1. kontakt mikroorganismu – hostitele a příslušného mikroorganismu
2. adherence mikroorganismu
3. invaze do hostitelského organismu – průnik mikroorganismu do vnitřního prostředí makroorganismu

Stupně 2. a 3. jsou ještě provázány dalším důležitým dějem, který bychom mohli uvést jako doplňkový 4. stupeň infekce, jedná se o produkci toxinů. Jestliže je adheze vlastností patogenů i symbiotické mikroflóry, pak je zřejmé, že mohou v některých případech vzájemně soutěžit o vazebná místa – receptory, což je jedním z principů antagonismu fyziologické mikroflóry vůči primárně i oportunně patogenní mikroflóře, jak už bylo zmíněno výše. Můžeme tedy říci, že kvantitativní porucha fyziologické mikroflóry zvyšuje možnost adheze patogenů, a tím jejich množení, invazi a produkci toxinů [6].

2.3 Mikrobiální kultury používané jako probiotika

Probiotika jsou ve své podstatě bakterie mléčného kvašení. Bakterie obecně jsou po fyziologické stránce různorodé prokaryotní mikroorganismy, po stránce morfologické se jedná o organismy velice podobné. Tvar buněk je odvozován od tyčinek nebo koků a jejich velikost se udává řádově v několika μm . I přes malé rozměry se bakterie vyznačují velkým specifickým povrchem, který jim umožňuje intenzivní kvantitativní a kvalitativní přeměnu

látek z okolí. Pokud se podíváme na bakterie z fyziologického hlediska můžeme o nich říci, že se jedná o heterotrofní mikroorganismy, které získávají živiny přeměnou organických látek. Produktem jejich metabolismu můžou být látky pro člověka prospěšné např. kyselina mléčná.

V probiotických jako doplňcích stravy jsou nejdůležitější skupinou právě bakterie mléčného kvašení, do této skupiny můžeme zařadit některé druhy rodů *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium*. S výjimkou bifidobakterií jsou všechny rody fylogeneticky příbuzné. Zvláštní postavení bifidobakterií se odráží i v jejich odlišném technologickém významu. Ostatní bakterie mléčného kvašení jsou vlastní mikroflórou potravinových substrátů a v potravinářské technologii se proto můžou v zásadě využívat přímo bez očkování. Naproti tomu bifidobakterie jsou typickou součástí intestinálního traktu lidí a zvířat a v přírodě jsou primárně přítomné ve fekálně kontaminovaných substrátech. Právě bakterie mléčného kvašení tvoří velkou skupinu nepohyblivých, nesporulujících grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek a tvoří při tom hlavně kyselinu mléčnou.

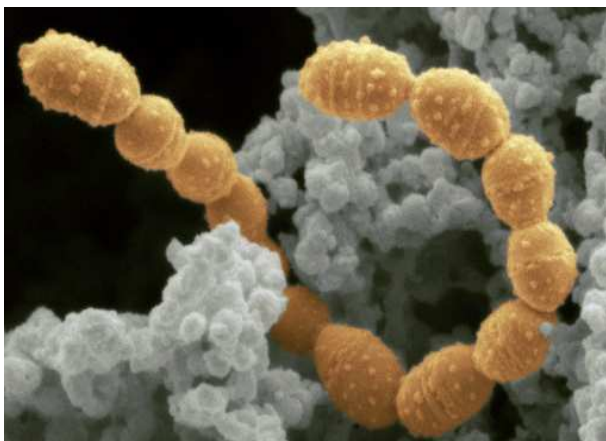
Společným znakem bakterií mléčného kvašení je tvorba kyseliny mléčné z fermentovatelných sacharidů. Dále je možné bakterie mléčného kvašení dělit podle hlavních a vedlejších terminálních fermentačních produktů na homofermentativní, které fermentovaný sacharid přemění skoro výhradně na kyselinu mléčnou a heterofermentativní přeměňují fermentovaný sacharid na kyselinu mléčnou (> 50 %), kyselinu octovou, CO₂ a za určitých podmínek i ethanol. U některých druhů bakterií mléčného kvašení je možné použít jako identifikační znak i konfiguraci a optickou otáčivost fermentací vzniklé kyseliny mléčné. Z morfologického hlediska se u těchto bakterií setkáváme s menší pestrostí, nacházíme koky v párech, krátkých a delších řetízích, tyčinky izolované a v řetízích a u bifidobakterií nacházíme větvené tyčinky.

Bakterie mléčného kvašení jsou mikroorganismy s velkým technologickým významem, které se používají jako výrobní prostředky při fermentačních procesech v technologii zakysaných a kvašených potravin a pochutin živočišného a rostlinného původu. Zde plní svoji hlavní úlohu, požadované kysnutí příslušných potravin, tj. fermentaci sacharidů na kyselinu mléčnou a octovou a vedlejšími produkty metabolismu přispívají k typické chuti a aroma příslušného fermentovaného produktu [7].

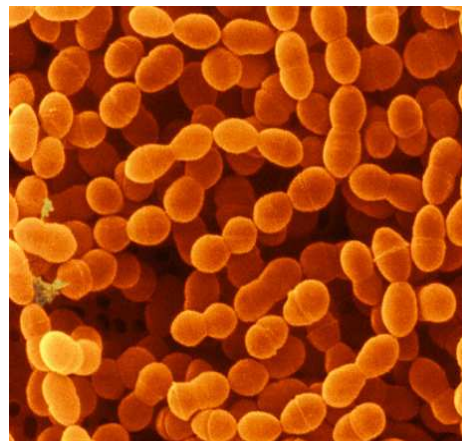
2.3.1 Rod *Streptococcus*

Buňky streptokoků mají kulatý nebo vejcovitý tvar s průměrem menším než 2 μm. Když rostou v tekutém médiu, jsou usprádané do párů, krátkých nebo delších řetízků a jsou obvykle nepohyblivé. Netvoří spory. Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní, katalázo-negativní mikroorganismy. Fermentují sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou. Optimální teplota růstu je 37 °C a nižší.

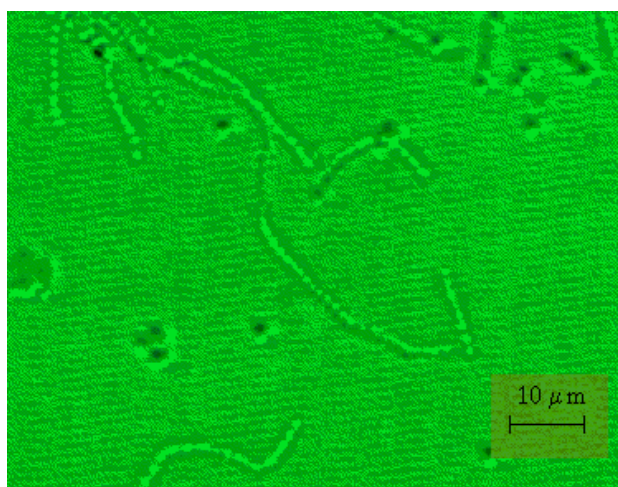
Streptococcus thermophilus: Patří do skupiny mléčných bakterií a používá se i v technologii mléčných výrobků. Tento grampozitivní mikroorganismus se řadí k teplomilným typům a jeho teplota růstu se pohybuje okolo 30 °C. Většinou tvoří nepohyblivé koky bez spor, které jsou uspořádány do párů nebo řetízků. Jde o fakultativně anaerobní mikroorganismus.



Obr.2: Tvar *Streptococcus thermophilus* [30]



Obr.3: Tvar *S. thermophilus* [31]

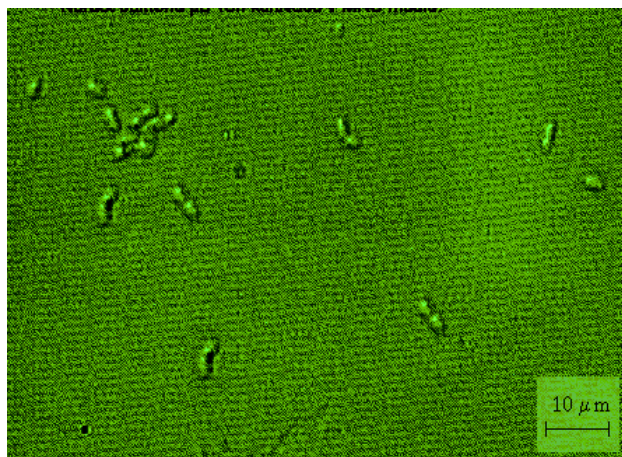


Obr.4: *Streptococcus thermophilus* [32]

2.3.2 Mléčná skupina - rod *Lactococcus*

Do mléčné skupiny streptokoků, tedy v rodě *Lactococcus* se nachází druhy: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garviae* a *Lactococcus plantarum*. Jedná se o grampozitivní aerotolerantní bakterie ve tvaru koků.

***Lactococcus lactis* ssp. *lactis*:** V mlékárenství patří k nejrozšířenějším a nejvyužívanějším mikroorganismům a stal se nedílnou součástí výroby mlékárenských kultur. Buňky tohoto druhu mají vejcovitý tvar o průměru 0,5-1,0 μm, vyskytuje se většinou v párech nebo v krátkých řetízcích. Optimální teplota pro jeho růst se pohybuje kolem 30 °C. Pro tento mikroorganismus je charakteristické, že nefermentuje sacharózu (nebo jen v nepatrném množství), ale naopak fermentuje glukózu, laktózu a maltózu homofermentativním kvašením na kyseliny mléčné. V mléku tvoří 0,8-0,9 % kyseliny mléčné.



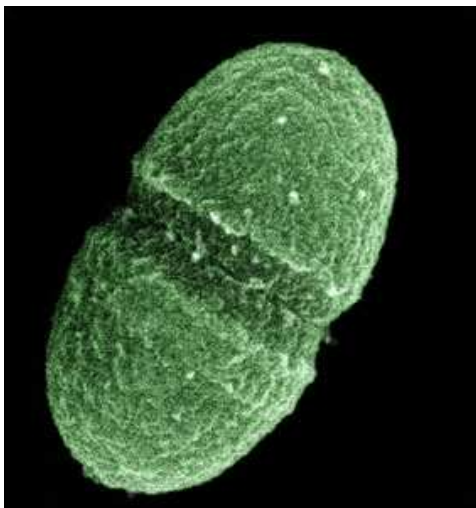
Obr.5: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* [33]

***Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*:** Tento druh bývá také často nazýván smetanový streptokok. Od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se liší svou nižší optimální teplotou růstu, tvoří měřitelné množství CO₂ a po morfologické stránce tvoří větší buňky a delší řetízky. Při pěstování tohoto druhu v mléce můžeme pozorovat pomalejší fermentaci laktózy než to dokáže *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, jinak jsou si tyto druhy mikroorganismů velmi podobné.

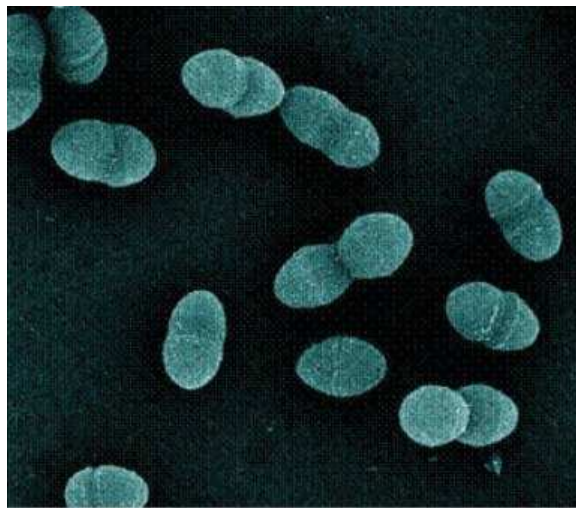
2.3.3 Enterokoková skupina - rod *Enterococcus*

Tato skupina se hojně využívá pro její pozitivní biochemické vlastnosti. Pojmenování *Enterococcus* vychází z poznání původního stanoviště rodu – intestinální systém lidí a některých zvířat. Z tohoto důvodu lze tyto bakterie nalézt i v mikroflóře výkalů. Enterokoky fermentují sacharidy podobně jako předchozí skupiny. Obsah kyseliny mléčné bývá udáván 0,66%. Tyto bakterie neredukují dusičnan na dusitan, nerozkládají celulózu ani tuky.

***Enterococcus faecalis*:** Tvoří vejcovité buňky, které mohou měřit v prodloužené části 0,5-1,0 μm. Uspořádání pozorujeme do párů nebo do krátkých řetízků. Má sérologickou skupinu D, optimální teplota růstu je 37 °C. *Enterococcus faecalis* fermentuje glukózu za tvorby kyseliny mléčné, na neutrálním bujónu fermentací může také tvořit větší množství kyseliny mravenčí, octové a etanolu.



Obr.6: Tvar *Enterococcus faecalis* [34]



Obr.7: Tvar *Enterococcus faecalis* [35]

2.3.4 Rod *Lactobacillus*

Obecně o této skupině můžeme říci, že se jedná o nejrozsáhlejší skupinu mléčných bakterií a zahrnuje zhruba 50 druhů. Laktobacily běžně obývají intestinální trakt lidí, perorální, vaginální prostředí člověka. Rod *Lactobacillus* v sobě zahrnuje fakultativně anaerobní a mikroaerofilní nepohyblivé tyčinkové bakterie mléčného kvašení. Hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná, ale také octová, etanol a CO₂. Bakterie *Lactobacillus* nalezneme ve fermentovatelných rostlinných i živočišných materiálech, nevíc však v trávicím a zažívacím traktu člověka a zvířat. Tyto bakterie řadíme mezi saprofyty a velmi zřídka se jedná o patogeny.

Laktobacily rostou, rozmnožují se a metabolizují při anaerobních podmínkách ale i při nízkém obsahu kyslíku v prostředí, které ale poskytuje dostatek fermentovatelných sacharidů, štěpitelných produktů bílkovin, nukleových kyselin a některých vitamínů. Laktobacily upřednostňují mezofilní a mírně termofilní teploty.

V přírodě tyto bakterie můžeme najít na povrchu neporušených rostlin, ve skupině s ostatními bakteriemi mléčného kvašení je naproti tomu najdeme na rozkládajícím se rostlinném materiálu. Mezi další významné stanoviště patří maso a masné výrobky, marinované rybí produkty a asi nejznámější je mléko a mléčné produkty.

Mléko po opuštění vemene při aseptickém dojení neobsahuje žádné laktobacily, ty se do něj dostanou z vnějšího prostředí. Streptokoky v mléce sice rostou rychleji a proto je jejich koncentrace v čerstvém mléce vyšší než laktobacilů, ale laktobacily jsou odolnější proti kyselému prostředí, proto je tedy časem jejich koncentrace vyšší než streptokoků.

Nejvýznamnějším druhem je *L. acidophilus*. Připisuje se mu blahodárny účinek na zdraví. Využívá se ve velkém měřítku i při průmyslové výrobě acidofilního mléka pro lidi a sušeného acidofilního mléka pro krmné účely. Kyselá mléka a farmaceutické preparáty s obsahem této bakterie se používají na obnovení normálního složení střevní mikroflóry po aplikaci antibiotik. *L. salivarius* je pravděpodobně nejtypičtější zástupcem bakterie ústní dutiny, ale také ho najdeme v zažívacím traktu lidí.

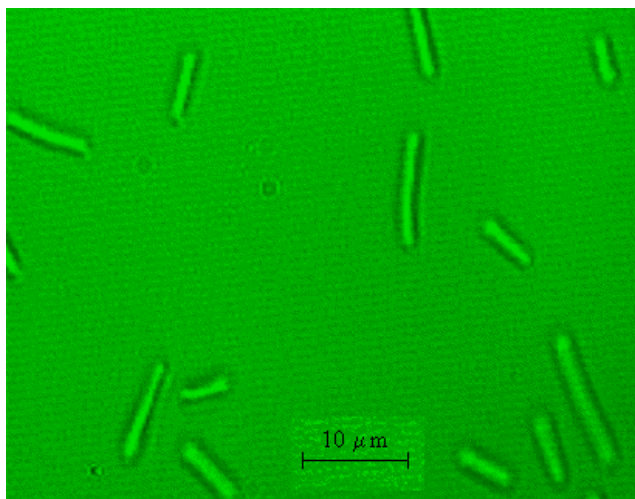
Laktobacily můžeme obecně rozdělit do tří skupin:

Tab. 3: Rozdělení laktobacilů [7]

Skupina I	<i>Obligátní homofermentativní laktobacily</i>
	<ul style="list-style-type: none"> - hexózy fermentují skoro výhradně na kyselinu mléčnou - pentózu a glukonáty nefermentují - tato skupina obsahuje všechny termobakterie
Skupina II	<i>Fakultativně heterofermentativní laktobacily</i>
	<ul style="list-style-type: none"> - hexózu fermentují téměř výhradně na kyselinu mléčnou - některé druhy produkují při nedostatku glukózy kyselinu octovou, etanol a kyselinu mravenčí - pentózu fermentují pomocí indukovatelné fosfoketolázy
Skupina III	<i>Obligátně heterofermentativní laktobacily</i>
	<ul style="list-style-type: none"> - hexózu fermentují na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou (etanol) a CO₂ - pentózy fermentují na kyselinu mravenčí a kyselinu octovou

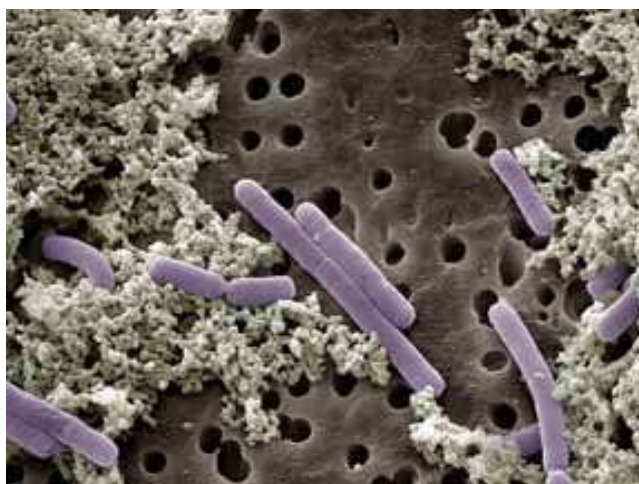
Buňky laktobacilů jsou ve většině případů tyčinkovitého tvaru, vykazují ovšem velkou variabilitu, mohou být dlouhé, mírně ohnuté a kulovité. Tyto odchylky ovlivňuje stáří kultury, složení kultivačního média a tenze kyslíku v prostředí. Charakteristické vlastnosti jednotlivých druhů ale zůstávají zachovány. Laktobacily jsou grampozitivní a metabolicky se nachází na hranici mezi aerobním a anaerobním mikroorganismem. Hlavní metabolické pochody fermentace hexóz se uskutečňují podle metabolických drah měnící buď 1 mol hexózy na 2 moly kyseliny mléčné (homolaktická fermentace) nebo podle 6-fosfoglukonátové dráhy, kdy dojde k přeměně na 1 mol CO₂, 1 mol etanolu (nebo kyseliny octové) a 1 mol kyseliny mléčné (heterolaktická fermentace). Za aerobních podmínek vzniká kyselina octová a etanol v poměru odvíjejícím se od množství kyslíku v prostředí. Při obou dvou typech fermentace se vzniklý pyruvát dále metabolizuje za vzniku různých terminálních produktů. Mezi nejznámější kmeny tohoto rodu patří: *L. rhamnosus*, *L. reuter*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

***Lactobacillus acidophilus*:** Tento kmen byl charakterizován jako grampozitivní tyčinka o rozměru 2 – 10 µm. Jeho metabolismus je založen na homofermentativní anaerobní fermentaci a má optimální teplotu růstu při teplotě 37 – 42 °C, přežívá i v prostředí s pH 3,5. Ze všech kmenů laktobacilů je *L. acidophilus* nejznámější a komerčně se distribuuje jako probiotikum.



Obr.8: *Lactobacillus acidophilus* [36]

***Lactobacillus casei*:** Také tento kmen patří k jednomu z nejpoužívanějších v průmyslovém zpracování mléčných produktů. Jedná se o anaerobní mezofilní bakterie, které řadíme ke grampozitivním mikroorganismům, zaujímají hlavně tvar tyčinky. Neobsahují žádné cytochromy. *L. casei* lze nalézt na různých stanovištích jako jsou sýrové a kvašené mléčné produkty, ale také střevní trakty a reprodukční systém člověka a zvířat a fermentované rostlinné produkty. Optimální pH pro tuto kulturu se pohybuje kolem hodnoty 5,5. Kyselina mléčná vyprodukovaná tímto kmenem je významná, protože bývá využívána k snížení cholesterolu, posílení imunitní reakce, zmírnění průjmu, ke snížení nesnášenlivosti k laktóze a inhibici střevním patogenům.



Obr.9: Tvar *Lactobacillus casei* [37]

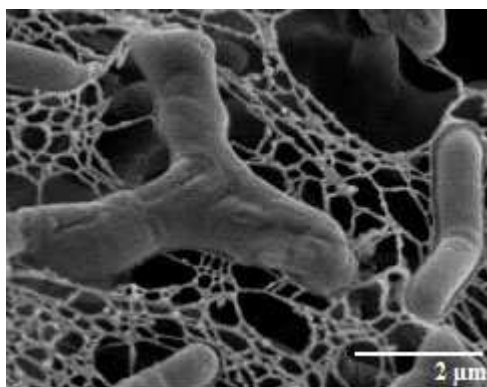
2.3.5 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie hrají významnou úlohu v intestinálním traktu savců. Z fermentovatelných sacharidů produkují kyselinu octovou a kyselinu mléčnou, které inhibují nežádoucí bakterie a stimulují intestinální peristaltiku. Kyselina octová, kterou bifidobakterie produkují ve větším množství než kyselinu mléčnou (v poměru 3:2), má silnější antagonistický účinek na nevíтанé gramnegativní bakterie. Jejich technologický význam spočívá v tom,

že se sekundárně přidávají do speciálních fermentovaných mlék určených pro preventivní terapeutické použití.

Bifidobakterie jsou velmi nepravidelné, často se větvící grampozitivní, většinou striktně anaerobní a katalázo-negativní tyčinky, které nesporulují. Jsou nepohyblivé a nesnášejí velmi kyselé prostředí. Rostou buď jednotlivě nebo v řetízcích, ve hvězdicovitém, palisádovém nebo jiném uspořádání. U kolonií pozorujeme smetanově lesklé zbarvení s hladkými okraji. Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 37 až 41 °C a optimální hodnota pH pro růst je 6,5 až 7,0. Při svém sacharolytickém metabolismu produkují teoreticky z 2 molů hexózy 3 moly kyseliny octové a 2 moly L(+)-kyseliny mléčné. CO₂ netvoří. Jako vedlejší produkty tvoří i malé množství kyseliny mravenčí, etanolu a kyseliny jantarové. Některé kmeny vykazují v mléku mírnou proteolytickou aktivitu. Nejznámější kmeny jsou: *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*.

***Bifidobacterium longum*:** Tento kmen můžeme popsat jako grampozitivní, anaerobní a rozvětvené tyčinky, které nejsou pohyblivé. *B. longum* v tlustém střevě zkvašuje celou řadu cukrů na kyselinu mléčnou. Obsahuje bílkoviny, které dokáží zvrátit oxidační poškození bílkovin a tuků, také obsahuje geny, které mohou syntetizovat asi 19 různých aminokyselin z amoniaku a další klíčové biosyntetické prekurzory [7].



Obr.10: *Bifidobacterium longum* [38]

2.4 Mechanismus účinku probiotik

Dítě v děloze plave a pije sterilní plodovou vodu. Při narození je tedy i lidské tělo naprosto sterilní. Kolonizace slizniční membrány začíná při porodu a prvním nádechem. Osídlování mikroorganismy probíhá velmi rychle v průběhu prvního dne života, ale množství a druhové zastoupení se výrazně mění ještě během prvních dvou let života. V této době nastává rychlý sled v střídání osídlovaných druhů bakterií v závislosti na vlivů prostředí, včetně mateřské mikroflóry, druhu porodu (císařský řez, vaginální porod), věk při narození, hygienická opatření, vliv antibiotik, pořadí narozeného dítěte a typ krmení novorozence. Předpokládá se, že typ porodu, má vliv na střevní mikroflóru, která přesahuje několik prvních dnů života. Císařský řez je spojen s poklesem prospěšných obligátních anaerobních bakterií *Bacteroides* a *Bifidobacterium* a současně s zvýšeným výskytem rodu *Clostridium* sp.

Rozdíly v diferenciaci střevní mikroflóry můžeme pozorovat u novorozenců kojených matkou a krmených z láhve umělou výživou. Dítě kojené získává prospěch z dodaných imunoregulátorů živin, ale také přijímá do svého těla metabolicky výhodné esenciální mastné kyseliny a prebiotika ve formě oligosacharidů, toto všechno získá z mateřského mléka.

Naproti tomu u kojenců krmených výživou z láhve bylo zaznamenáno větší množství symbiotické mikroflóry celkově, včetně koliformních bakterií, *Streptococcus* sp, *Clostridium difficile* a dalších clostridiálních druhů. Výskyt *Clostridium difficile* činí u dětí kojených umělou výživou 50 % - 60 %, naproti tomu u dětí kojených matkou se tyto procenta pohybují v rozmezí 6 % - 20 %. Tato bakterie ovšem nemá stejný stupeň patogenity u kojenců jako u starších dětí a dospělých. S věkem zastoupení *Clostridium difficile* klesá úměrně se stárnutím vzorku zkoumané populace [8]. Také bylo zjištěno, že u kojenců je vyšší výskyt bifidobakterií ve stolici, než u kojenců krmených umělou výživou [9]. Studie *Milova* prokázala u časně odstavených dětí, že v pozdějších letech daleko častěji dochází k výskytu průjmů a potravních alergií [6]. Tak jako dítě přechází k tuhé stravě, tak i jeho střevní mikroflóra se stává více podobná složení mikroflóry dospělého člověka [8]. Rozdíly v mikroflóře u dospělých jedinců jsou dány především dvěma faktory, zaprvé je to místo dlouhodobého pobytu. Bylo prokázáno, že se významně liší struktury mikroflóry obyvatel Severní Ameriky a Bangladéše, a tento rozdíl přetrvává i dlouho po přesídlení. Druhým faktorem jsou stravovací návyky jedince. Změny ve vyšším věku se týkají především, respektive pouze, střevní mikroflóry. Jsou přitom charakterizovány zachováním kvalitativní struktury, mění se pouze kvantitativní zastoupení jednotlivých složek, především anaerobů.

Z terapeutického hlediska dokážeme docílit modulace mikroflóry trávicího traktu pomocí léčebných postupů. V této oblasti dochází jak k žádoucím účinkům – léčebným, tak bohužel i k nežádoucím, které jsou součástí vedlejších účinků určitých léčiv a léčebných postupů. Terapeutické zásahy do mikroflóry trávicího traktu dnes využívají tuto základní škálu:

- diety
- antibiotickou léčbu
- střevní dezinfekci
- mikrobiologickou terapii, kam patří probiotika, prebiotika a jejich směsi označované jako symbiotika [6]

Variace ve složení gastrointestinální mikroflóry během prvních dvou let života mají důsledky na schopnost střevní mikroflóry optimalizovat mnohé aktivity ve výživě a metabolismu, obrany a imunitního systému. Mnoho druhů se vyvinuly, aby „přátelsky“ koexistovaly v trávicím traktu lidí a některých zvířat. Různé druhy bakterií následně interagují s vrozeným imunitním systémem a hrají klíčovou úlohu v jeho dynamickém rozvoji a adaptaci, podporují udržení jeho rovnováhy, rozvoj a růst [8, 9].

Jak už bylo zmíněno probiotika neslouží jen ke stabilizaci střevní mikroflóry ale mohou také potenciálně modulovat funkci imunitních buněk. Mikroorganismy ve střevě se mohou podílet na aktivaci imunitního systému prostřednictvím několika možných tras (Obr. 11) [10].

Organismus je vybaven mechanickými, chemickými a imunologickými bariérami, které v místech kontaktu brání nekontrolovatelnému průniku antigenních a mitogenních podnětů do vnitřního prostředí organismu. K hlavním bariérám a kontaktním místům patří slizniční povrchy zažívacího, dýchacího a urogenitálního traktu. Imunitní systém sliznice střevní stejně jako dalších sliznic zajišťuje tři základní úkoly:

- bariéru proti patogenním mikroorganismům
- bariéru proti imunogenům

- nereaktivnost organismu vůči těm složkám potravy, které se do něj dostaly v imunogenní podobě

K základním rysům slizničního imunitního systému patří převaha protilátek třídy IgA, předností je osídlování sliznic a exkrečních žláz buňkami, které pocházejí z lymfatických foliklů střevních (tzv. homing) a konečně transport polymerních imunoglobulinů do sekretu prostřednictvím epitelových buněk.

Lymfoidní tkáň střeva (GALT – gut associated lymphoid tissue) je systém, který během života zpracuje informace asi ze 100 – 200 tun potravy a je permanentně osídlen fyziologickou a intermitentně i nefyziologickou mikroflórou. Vývoj GALT probíhá hlavně v časném postnatálním období a tvoří ji:

- organizovaná lymfoidní tkáň;
- volné intraepitelové lymfocyty (IEL);
- lymfocyty lamina propria

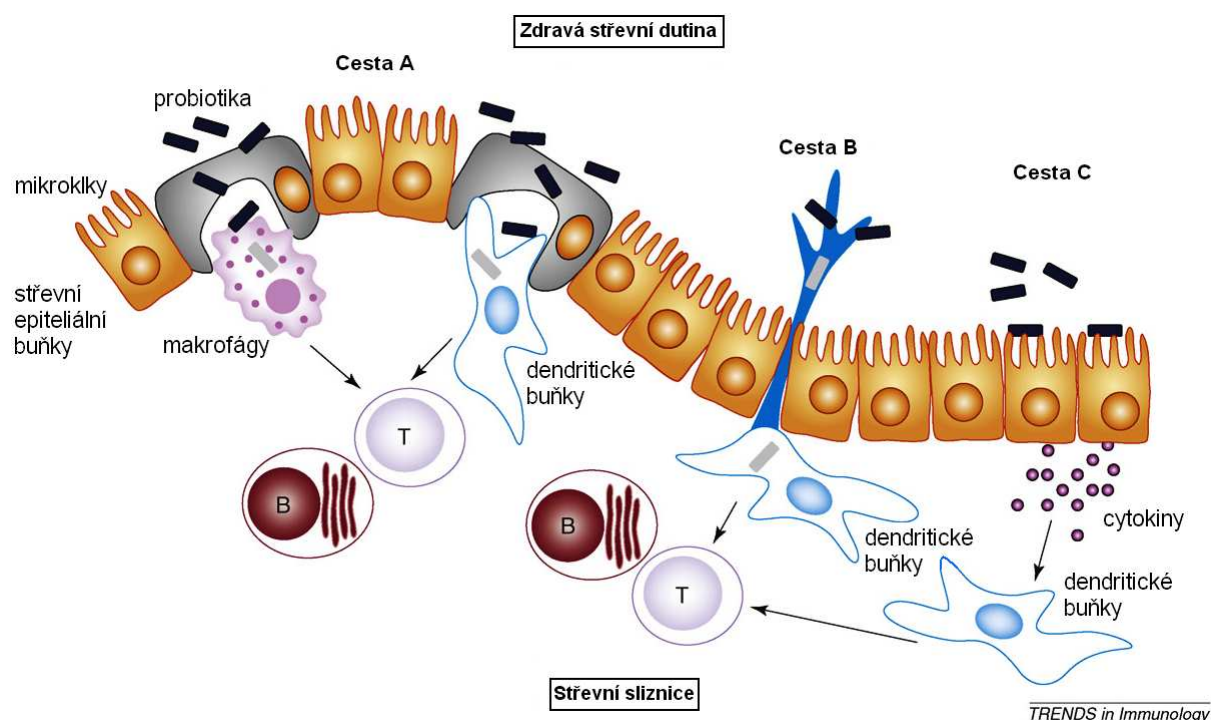
Organizovaná lymfoidní tkáň je kryta epitelovou vrstvou, která však obsahuje zvláštní tzv. M buňky (microfold cells), jimž chybí kartáčový lem, a naopak jsou v úzkém kontaktu s buňkami lymfatických foliklů. M buňky mohutně pohlcují antigeny, které patrně translokují do prostředí foliklů, čímž indukují slizniční imunitní reakci. Přitom však M buňky nejsou vybaveny znaky hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy, jinak řečeno, informace pouze přenášejí bez dalšího imunologického zpracování.

Volné intraepitelové lymfocyty (IEL) jsou vmezeřeny mezi epitelem klků. Většinou se jedná o T lymfocyty, převážně CD4 (T helper) nebo CD8 (T supressor) vzácně CD (které patří k B lymfocytům). Na thymu (brzlíku) není závislých 50 – 60 % T lymfocytů, tj. vyvíjejí se extrathymově. IEL produkují lymfokiny hrající zřejmě rozhodující úlohu v antimikrobiální ochraně sliznic. Současně jsou tyto T lymfocyty schopny reagovat s autoantigeny. Poslední klíčovou úlohou IEL je orální tolerance. Jedná se o řízený útlum reakce na antigenní složky potravy, který ne zcela jasným mechanismem brání, aby vznikla neúměrná reakce na imunogenní podněty potravy, např. v podobě potravinové alergie. IEL v průběhu ontogenetického vývoje jedince prodělávají význačné změny ve svém složení, hlavně v závislosti na vývoji střevní mikroflóry.

Lymfocyty lamina propria, zde se jedná převážně o CD4 lymfocyty, a to podle produkovaných lymfokinů ze subpopulace Th1. Méně přítomny jsou v lamina propria mucosae také B lymfocyty, produkující IgA, méně IgM a nejméně IgG imunoglobuliny.

Imunitní reakce na sliznici trávicího traktu nevedou pouze k odpovědi lokální, ale také v cirkulaci a na sliznicím vzdálených systémech (tzn. společný slizniční imunitní systém). Buňky, především ve střevní sliznici, po kontaktu s antigeny migrují lymfatickou cestou do krevního řečiště, a odtud do všech sliznic a endokrinních žláz.

Fyziologická střevní mikroflóra provádí tzn. konstantní trénink imunitního systému trávicího traktu, který tvoří jednak bariéru invazi cizích zárodků, a jednak vede k tzv. paraimunitě, tedy ke zvýšení specifického i nespecifického imunitní odpovědi. Děje se tam zvyšováním fagocytární schopnosti mikrofágů, stimulací IgA produkujících plazmocytů lamina propria mucosae a zvýšením produkce IL-6 [6].



Obr.11: Možné cesty účinku probiotik ve střevní dutině [10]

2.5 Výživa dětí od narození

Velký podíl na správném vývoji dítěte a na jeho zdraví má výživa. V současné době existuje shoda v tom, že optimální způsob výživy kojence v prvních šesti měsících života je kojení s tím, že mléčné porce mají být saturovány i v dalším období mateřským mlékem. První půl rok je velmi senzitivní období, ve kterém je těsný vztah mezi kvalitou výživy a růstovou rychlostí, které je spojeno s rizikem pozdějšího rozvoje kardiovaskulárních nemocí a metabolického syndromu. Předpokladem zavedení KV (komplementární výživa = nemléčné porce stravy) je psychomotorická a fyziologická zralost kojence, která je z hlediska žádoucích schopností u donošeného dítěte dosahována nejdříve na konci 4. měsíce života. Publikované studie ukazují, že v našich podmínkách není u kojenců v druhém půlroce života a u batolat dosahováno optimální nutriční saturace, především v oblasti zásobení železem a mikronutrienty ve srovnání se stávajícími výživovými doporučeními.

Je dobré si uvědomit, že do dvou let je spotřeba tuků relativně vysoká a že není třeba příjem omezovat. Při výběru potravin musíme preferovat bohaté zdroje železa, vápníku, zinku a z vitaminů pak zdroje vitaminů D, B 6 a B 12. Železa je v mateřském mléce velice malé množství, ale je velmi dobře využitelné. Po dosažení věku dvou let děti konzumují více či méně modifikovanou stravu dospělých. V tomto věku doporučujeme, aby energetický podíl tuků nepřesahoval 30 %.

Dětem od 1,5 roku do 3 let je určena strava batolat, pokud jejich onemocnění nevyžaduje jinou speciální dietu. Jídelní lístek batolat má obsahovat jídla lehce stravitelná a měkká, nenáročná na kousání. Jídelní plán má být v souladu s požadavky na racionální dětskou výživu. Má to být pestrá, smíšená strava, biologicky hodnotná. Kuchařská úprava má být jednoduchá bez koření [12]. Probiotika jsou dětem nasazována většinou při výskytu některého z průjemových onemocnění nebo při zácpě. Obecně lze říci, že probiotika bývají nasazována

v nejtělejší věku dítěte až při objevení symptomů nějakého onemocnění nebo při následcích antibiotikové léčby.

2.6 Probiotika a jejich vliv na zdraví

Jak už bylo napsáno výše, probiotika mají v dnešní době nepopíratelný kladný vliv na zdraví člověka. Ovšem, aby došlo k očekávanému efektu, musí probiotický preparát obsahovat určité minimální množství kolonie tvořících jednotek (CFU) na dávku. Dávky používané v prevenci a léčbě se velmi liší. Denní dávka 10^6 až 10^9 CFU se považuje za minimální účinnou dávku pro terapeutické účely. Druhou stránkou takového probiotického preparátu je mikrobiální obsah. Účinek probiotik je pravděpodobně totiž závislý nejen na dávce ale také na specifickém kmenu. Pro náležité použití je proto nezbytné přesné označení používaných preparátů [13].

Probiotické bakterie se podílí na lepší toleranci potravy, příznivě ovlivňují ostatní střevní mikroflóru, brání úchytu a negativnímu působení patogenních mikroorganismů, stimulují střevní motilitu a pozitivně zasahují do řady dalších fyziologických procesů v trávicím traktu. Významnou úlohu probiotických bakterií je stimulace imunitního systému dítěte. Je dobře známo, že přítomnost probiotických bakterií v trávicím traktu pomáhá lépe hydrolyzovat a tím i vstřebávat bílkovinu. Účinkem mírné lipázové aktivity probiotických bakterií dochází k lepší utilizaci tukových částic. Aktivace laktázy zlepšuje toleranci a využití laktózy z mléčné výživy dítěte. Za přítomnosti probiotických mikroorganismů se například zlepšuje vstřebávání vápníku a zvyšuje se přirozená syntéza vitamínů skupiny B. Probiotické mikroorganismy rovněž podporují motilitu trávicího traktu [14].

Níže jsou uvedena onemocnění, při jejichž léčbě byl prokázán pozitivní přínos probiotik či do budoucna se počítá s jejich širším využitím.

Akutní průjemová onemocnění

Mechanismus, kterým probiotika působí preventivně nebo léčebně, může být prostřednictvím stimulace imunitního systému kompeticí o vazebná místa na střevní sliznici nebo tvorbou bakteriocinů, jako je nisin. Tyto a další mechanismy jsou závislé na typu průjemového onemocnění, a proto mohou být různé u virového průjmu, antibiotiky způsobeného průjmu a u průjmu cestovatelů [15].

Průjemová onemocnění po léčbě antibiotiky

Mezi nejčastější vedlejší účinky ATB (antibiotikové) terapie patří průjem. V kojeneckém a batolecím věku se objevuje u 8 – 30 % pacientů léčených ATB (ampicilin, cefalosporiny, klindamycin). Tento stav může být spojen s infekcí *Clostridium difficile*, většina epizod však není vyvolána tímto mikrobem. Mechanismus vzniku spočívá v kvalitativních a kvantitativních změnách střevní mikroflóry. Probiotika podávaná během ATB terapie ovlivňují výskyt, intenzitu i trvání průjemového onemocnění, a to i v případě, kdy se průjem objeví již v průběhu ATB terapie. Probiotika mohou být použita také v prevenci průjemového onemocnění při terapii ATB. U dětí byl prokázán účinek *Lactobacillus* GG, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Saccharomyces boulardii* [13].

Virové průjemové onemocnění

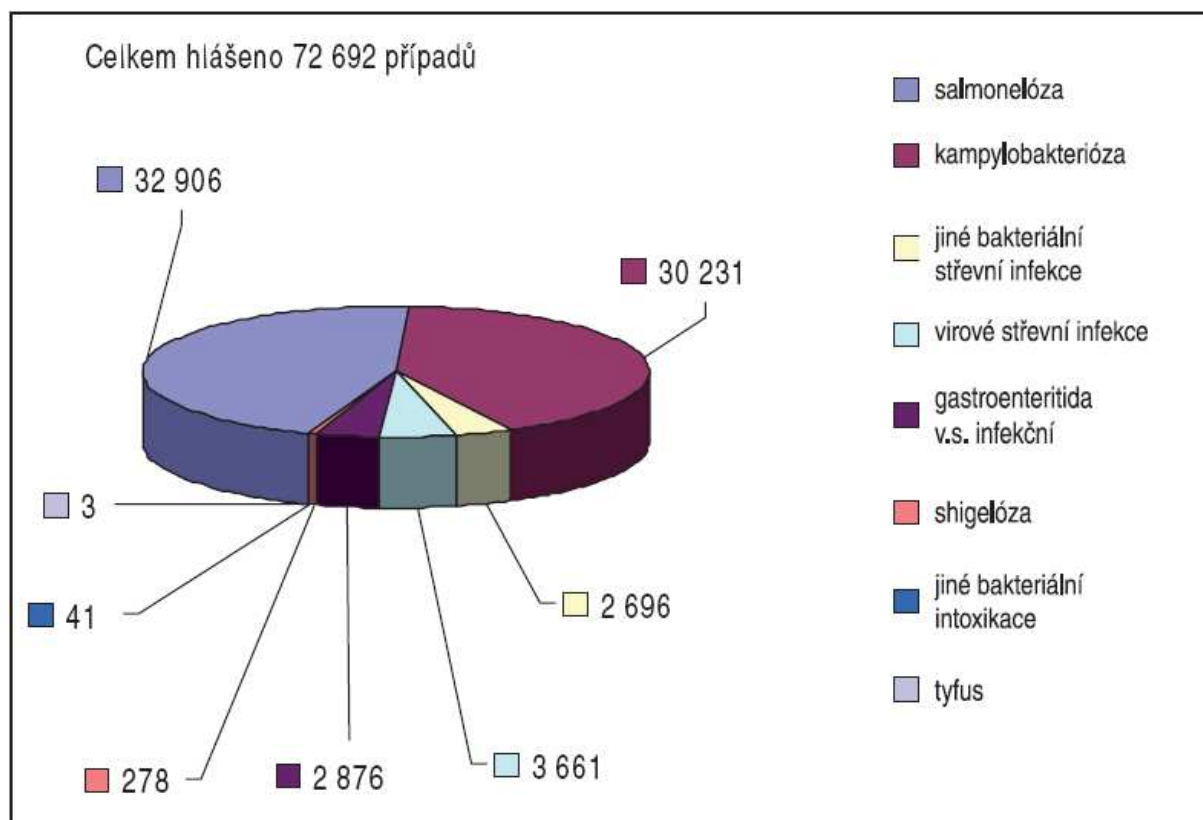
Viry jsou nejčastějšími etiologickými agens průjemových onemocnění u dětí ale mohou se vyskytovat i u dospělých. Mezi jisté vyvolavatele patří rotaviry, caliciviry, adenoviry, toroviry, picobirnaviry. Nejčastěji se u nás vyskytují rotaviry, ty se dělí do skupin A-E, lidská onemocnění vyvolávají rotaviry ze skupin A-C, ve světě nejobvyklejší je typ A. Rotaviry postihují tenké střevo a působí zřejmě více mechanismy. Dochází ke změně cylindrických epitelových buněk klků na kuboidní, ke zkrácení a zakrnění klků a nedostatku disacharidáz vedoucímu k intoleranci laktózy a následnému osmotickému průjmu. Malá absorpce laktózy může trvat i několik týdnů. Vedle toho dochází i ke zvýšení sekrece v buňkách krypt či produkci enterotoxinů a zřejmě i indukci sekrece tekutin a elektrolytů aktivací nervového systému střevní stěny [16]. Bylo prokázáno, že při léčbě probiotikem se zkrátila doba průjemového onemocnění o 0,7 dne (0,3 – 1,3 dne) a počet stolic se druhý den léčby zmenšil v průměru o 1,6 stolice denně (0,7 – 2,6) u dětí, které byly léčeny laktobacilem. Pozitivní účinek probiotik lze vysvětlit stabilizací střevní mikroflóry a kratším vylučováním rotavirů. Studie ukázaly, že podávání probiotik vede k významného vzestupu IgA specifických protilátek proti rotavirům v séru pacientů, což naznačuje, že humorální imunita hraje důležitou roli v mechanismu účinku probiotik. Probiotika byla také použita v prevenci akutní gastroenteritidy u dětí. Specifická IgA odpověď může vysvětlit preventivní účinek probiotik na průjemové onemocnění [15].

Infekční průjmy

Průjmy infekčního původu patří u dětí spolu s respiracemi a varicellou stále k nejčastějším infekčním onemocněním. Z celkového počtu každoročně hlášených průjemových onemocnění tvoří děti kolem 50 %, nejpostiženější věkovou skupinou jsou děti mezi 1-4 lety. Zdrojem těchto infekčních průjmů jsou rotaviry, které již byly popsány výše a také bakterie. Z bakteriálních infekcí se setkáváme nejčastěji se salmonelou a kampylobakteriózou, výskyt ostatních bakterií je ojedinělý.

V posledních letech je ve více než 95 % případů izolován jediný sérotyp, a to *Salmonella enteritidis*, která se přenáší zejména vejci a výrobky z nich, ale i nedostatečně tepelně upraveným masem. Onemocnění probíhá obvykle jako různě těžká febrilní gastroenteritida s bolestmi břicha, hlavy zvracením, zelenými stolicemi (u malých dětí často s příměsí krve), je možná dehydratace. V diagnostice je salmonel je u střevní formy rozhodující kultivace ze stolice.

Počet kampylobakterióz se v současné době rychle přibližuje počtu salmonelóz a v posledním desetiletí vzrostl více než desetinásobně. Souvisí to zřejmě se zvýšenou konzumací drůbeže a zlepšenou diagnostikou. Hlavním vyvolavatelem u nás je *Campylobacter jejuni*, mikroaerofilní bakterie vyžadující ke kultivaci speciální podmínky i půdy. Na rozdíl od rotavirů a salmonelóz (do 48 hodin) je inkubační doba delší – až týden. Kampylobakterióza typicky probíhá jako hemoragická enterokolitida s horečkou, bolestmi břicha a stolicemi s příměsí krve a hlenu. V diagnostice je u střevních forem rozhodující kultivace ze stolice na speciálních půdách obsahující antibiotika, prováděná při nízké tenzi kyslíku. V klasické léčbě těchto onemocnění se čím dál více rozšiřuje využití pozitivního účinku probiotik [17]. Využívají se zejména se *Lactobacillus* a *Saccharomyces boulardii* [18].



Obr.12: Graf zobrazující počet hlášených střevních infekcí v ČR v r. 2005 [17]

Idiopatické střevní záněty

Mezi idiopatické střevní záněty (ISZ) patří ulcerózní kolitida (UK) a Crohnova nemoc (CN). Jsou to chronická zánětlivá střevní onemocnění, která se mohou projevovat krvavými průjmy, bolestí břicha a malnutricí. Příčiny nejsou jasné a soudí se, že důležitou roli hraje interakce mezi zevními spouštěči a pacientovou vnímavostí. Identifikace zevních faktorů spojených s vývojem IBD je předmětem intenzivního studie [19].

V léčbě ulcerózní kolitidy byly publikovány studie především s kmenem *Escherichia coli* Nissie. Opakovaně byla prokázána stejná účinnost této léčby v udržení remise v porovnání se zlatým standardem léčby – mesalazinem. Podobný efekt mělo i podávání VSL#3 (obsahuje tři druhy *Lactobacillus* sp., tři druhy *Bifidobacterium* sp. a *Streptococcus thermophilus*). Pilotní studie ukazují, že v této indikaci by mohla být úspěšná i *Saccharomyces boulardii*.

U Crohnovy choroby nejsou na rozdíl od ulcerózní kolitidy výsledky probiotické léčby jednoznačné. Ve studii se 32 nemocnými bylo popsáno snížení počtu relapsů ve skupině, kde k mesalazinu byla přidána *Saccharomyces boulardii*. Další studie s podáním *Escherichia coli* Nissie resp. *Lactobacillus rhamnosus* GG tyto výsledky nepotvrdily [20].

Obecně lze říci, že optimální terapie ISZ vyžaduje odstranění dominantních mikrobiálních antigenů a blokádu odpovědí slizničního imunitního systému na tyto podměty. Z tohoto pohledu působí antibiotika a probiotika v terapii ISZ komplementárně. Antibiotika eliminují agresivní mikrobiální kmeny při akutních zánětlivých projevech a komplikacích ISZ. Probiotika příznivě ovlivňují různými mechanismy porušenou rovnováhu jednotlivých složek gastrointestinálního ekosystému [21].

Tab. 4: Probiotika při idiopatických střevních zánětech – účinky a jejich mechanismy [21]

<i>Inhibice střevních patogenů</i>
- snížení pH střevního obsahu
- sekrece mikrofonů a kolicinů
- kompetence o membránové receptory kolonocytů
- blokáda epiteliální vazby patogenů
- inhibice epiteliální invaze
<i>Posílení epiteliální a slizniční bariéry</i>
- tvorba krátkých mastných kyselin (zejména butyrátů)
- zvýšená produkce hlenů
- snížení propustnosti bariéry
<i>Úprava imunoregulací</i>
- indukce exprese a sekrece IL-10 a TGFβ
- stimulace tvorby sekrečního IgA
- snížení exprese TNFα

Zácpa u dětí

Zácpa u dětí rozumíme prodloužení intervalu vyprazdňování, nápadně tuhou až kamennou stolicí a obtížné vyprázdnění. Pro klinickou praxi je vhodné pro děti nad jeden rok považovat za fyziologické alespoň tři vyprázdnění za týden. 95 % dětí s obštipací trpí funkční zácpou, z velké většiny syndromy dysfunkce pánevního dna. Funkční zácpa se svým vznikem a průběhem liší od zácpy dospělých. Hlavním patofyziologickým mechanismem je bolest při vyprazdňování a strach z další bolestivé defekace. Nezbytné je odlišit zácpu jako symptom jiného onemocnění. Nedílnou součástí dlouhodobé léčby je i dieta, kdy je třeba dbát na zvýšený příjem tekutin, vstřebatelné i nevstřebatelné vlákniny, nevstřebatelných cukerných alkaloidů, medu. Dalším krokem bývá zařazení funkčních potravin do jídelníčku dítěte, jedná se zejména o probiotika a prebiotika (jogurty s bifidogenními kulturami, oligosacharidy). Hlavním důvodem použití probiotik u dětí s chronickou funkční obštipací může být zlepšení střevní motility či nález střevní dysmikrobie [13, 22]

Nekrotizující enterokolitida (NE)

Patogenické mechanismy u NE nejsou zcela známy. Nekrotizující enterokolitida je považována za multifaktoriální onemocnění, jehož incidence je u silně a extrémně nezralých novorozenců 2,6 – 2,8 %. Predisponující faktory jsou nezralost, nízká porodní hmotnost, mechanická ventilace, indometacin, terapie kortikoidy, nízké Agar skóre v 5. minutě po narození, infekce, polycytémie a kanylace umbilikální žíly. Probiotické kmeny *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou zjišťovány jen u 5 % dětí s velmi nízkou porodní hmotností a nízká kolonizace může být také predisponujícím faktorem NE. Potenciální mechanismus probiotik, ochraňující vysoce rizikové nedonošené děti od vývoje NE, spočívá ve vytvoření bariéry proti přechodu bakterií a bakteriálních produktů přes střevní sliznici, zlepšení nutrice enterocytů, kompetitivní inhibici vůči patogenům a modifikaci slizniční odpovědi k mikrobiálním produktům (a následným potlačením růstu dominantních patogenů, jako jsou *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Candida albicans* a *Clostridium difficile*). Probiotika (*L. acidophilus*, *B. infantis*) snížila riziko NE u nedonošených novorozenců. Aplikace velkých dávek živých mikrobů imunologicky nezralým dětem, často postižených dalšími komorbiditami, však podporuje potřebu dalších, nejlépe multicentrických

studií, aby mohly být získány další podklady pro účinnost a bezpečnost probiotických kmenů dříve, než bude obecně doporučeno používat probiotika v této indikaci. Tato obava je podpořena dvěma případy bakteriémie vyvolané *Lactobacillem* GG u kriticky nemocných nezralých novorozenců [13].

Infekce způsobená *Helicobacter pylori*

H. pylori je důležitý gastroduodenální patogen. Tento mikrob postihuje až polovinu světové populace. K infekci dochází primárně již v dětském věku. Byla prokázána souvislost mezi *H. pylori* a vznikem chronické gastritidy a peptidických vředů a žaludečních malignit (karcinom žaludku, lymfomy) [13, 23]. Standardní terapie *H. pylori* je založena na kombinaci antisekreční léčby (inhibitor protonové pumpy) a dvou ATB. V běžné praxi je stále větší problém se stoupající rezistencí na ATB a neúspěšnou eradikací. Proto je snaha trvale hledat nová účinnější léčebná schémata. Využití probiotik se jeví jako velmi nadějně a perspektivní. Studie *in vitro* ukazují supresivní účinek některých probiotik na *H. pylori*. Klinické studie u dospělých a dětí prokázaly vliv na kolonizaci žaludeční sliznice, zvýšení účinnosti eradikačních schémat, snížení nežádoucích účinků ATB a obnovení normální střevní mikroflóry při léčbě této chronické infekce. Prospektivní randomizovaná kontrolovaná studie potvrdila signifikační účinek probiotik a zvýšení účinnosti eradikačního schématu, doplněného o fermentovaný přípravek obsahující probiotikum *L. casei* DN-114 001, v léčbě *H. pylori* u symptomatických dětí [13]. Také se předpokládá, že některé kmeny laktobacilů příznivě ovlivňují projevy *H. pylori*, tím že snižují aktivitu ureázy a ornithindekarboxylázy v žaludeční sliznici, jakož i nežádoucí účinky eradikačního režimu a působí pravděpodobně i profylakticky na vznik infekce [21].

Atopie

Atopie je definována jako genetická dispozice k hypersenzitivním reakcím I. typu proti různým antigenům prostředí (atopická alergie). Nejčastějšími klinickými projevy jsou alergická rhinokonjunktivita, bronchiální astma, atopická dermatitida/ekzém (ADE) a méně často potravinová alergie [24]. Také můžeme říci, že atopie je typ alergické reakce, kterou zprostředkovávají alergen-specifické IgE protilátky [25]. Prevence atopických onemocnění vychází z poznatků, že k primární senzibilizaci dochází v nejranějším věku, zejména v prvních měsících a letech života, a také již před narozením. Nezbytným vznikem alergie je kontakt s alergenem v životním prostředí, obzvláště pak jeho vdechováním. Alergizaci však může napomáhat i znečištění vdechovaného vzduchu cigaretovým kouřem, plísněmi i jinými škodlivinami. Základem pro doporučení preventivního opatření je odhad rizika vývoje atopického onemocnění. Ten v praxi vychází z alergické anamnézy. U dětí s negativní rodinnou anamnézou bývá udávána pravděpodobnost výskytu alergie 5 – 10 %. V rodinách, kde je výskyt alergického onemocnění alespoň u jednoho rodinného příslušníka v příbuznosti 1. stupně (tedy rodič nebo sourozenec), je riziko onemocnění dítěte asi 30 % [26].

Atopická dermatitida je chronické zánětlivé, silně svědivé onemocnění kůže, které se většinou objevuje v prvních měsících života s charakteristickým vývojem klinického obrazu od dětství až do dospělosti. Pro alergický původ svědčí současný výskyt jiných alergických onemocnění jak u postiženého, tak v jeho příbuzenstvu, zvýšení sérových hladin imunoglobulinů E u 50 až 70 % nemocných, přítomnost vysoké hodnoty specifických IgE protilátek proti antigenům okolního prostředí a další. V prvním roce věku se manifestuje asi u 60 % postižených, u 85 % do 5 let věku. Přibližně u 75 % postižených se dermatitida

v období puberty zhojí, nebo přetrvávají mírné projevy. Závažná atopická dermatitida je charakterizována perzistujícími kožními změnami, pravidelným užíváním topických steroidů, koexistencí dalších alergických symptomů, jako jsou průjem, zvracení, rýma, dušnost, dále zpomaleným růstem a přítomností alergických symptomů i v období výhradního kojení dítěte [25].

Potravinová alergie – nejčastějšími alergeny, které se nacházejí ve stravě, jsou přirozeně se vyskytující (nativní) bílkoviny. Alergenní potravinové bílkoviny mají obvykle molekulovou hmotnost 10 až 60 kD. Alergenicitu těchto bílkovin lze snížit enzymatickou hydrolýzou, tepelnou úpravou anebo ultrafiltrací či kombinací těchto technik. Alergie na potraviny bývá často zaměňována za nesnášenlivost – intoleranci potraviny. Intolerance ovšem označuje nežádoucí reakci na určitou potravinu nebo složku, která se vyznačuje variabilní etiologií, ale nemá žádný imunologický základ. Alergická reakce na složky potravin je charakterizována pro rannou fázi atopického onemocnění. V kojeneckém věku se alergické symptomy týkají především pokožky (atopická dermatitida) a zažívacího ústrojí. Gastrointestinální příznaky má asi 60 % postižených, kožní projevy 50 – 60 % a respirační příznaky asi třetina kojenců s alergií bílkoviny kravského mléka (ABKM), příznaky se často kombinují. První období života je nesmírně významné pro senzibilizaci a pozdější rozvoj atopického onemocnění, důležitou roli zde má strava jakožto obrovský zdroj alergenních bílkovin. Bylo dokázáno, že mateřské mléko má přechodný preventivní účinek výskytu atopie.

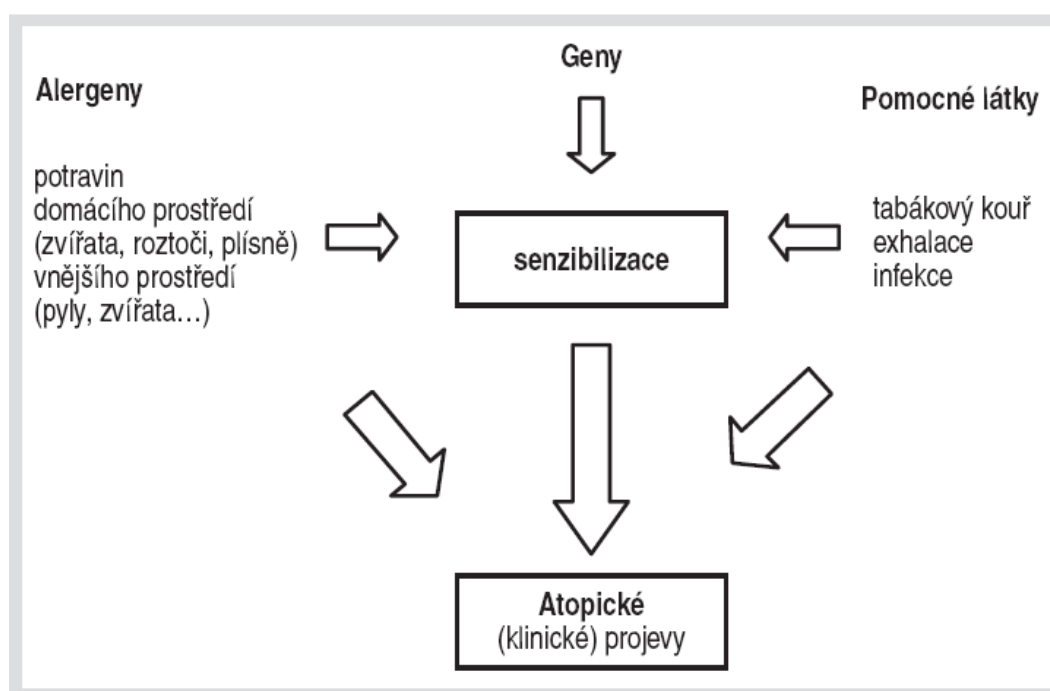
Podávání probiotik v léčbě atopické dermatitidy je určitou aplikací hygienické hypotézy. Po narození dochází k rychlé kolonizaci střeva mikrobi, u kojených dětí s převahou bifidobakterií a laktobacilů, u uměle živěných dětí je pak flóra více podobná mikroflóře dospělých s převahou etreobakterií, bacteroides, clostridií. Odlišné složení mikroflóry v nejútlejším věku, nízké hladiny bifidobakterií a vysoké hladiny klostridií představují rizikový faktor pozdějšího vývoje atopického onemocnění. Probiotika upravují zvýšenou střevní permeabilitu a zvyšují IgA odpověď ve střevě a tím zlepšují střevní bariéru, která bývá u dětí s atopickou dermatitidou a ABKM často narušena. Potenciál probiotik byl demonstrován v dvojité slepé, placebem kontrolované studii publikované v roce 2001, kde byla probiotika podávána prenatálně a po dobu 6 měsíců postnatálně dětem ve vysokém riziku rozvoje atopického onemocnění. Ve věku 2 let byla prevalence atopického ekzému poloviční (26 %) ve srovnání s kontrolní skupinou (46 %). Probiotika byla úspěšně využita v léčbě atopické dermatitidy u dětí s ABKM, u kterých došlo při současně podávané eliminační dietě ke klinickému zlepšení atopické dermatitidy a ústupu systémových i střevních markerů alergického zánětu [25].

Tab. 5: Souvislost rodinné anamnézy se vznikem atopického onemocnění [25].

<i>Rodinná anamnéza atopie</i>	<i>Riziko vzniku atopického onemocnění</i>
negativní	5 – 15 %
postižený jeden rodič	20 – 40 %
postižený sourozenec	25 – 30 %
postižení oba rodiče	40 – 60 %
stejná orgánová manifestace u obou rodičů	60 – 80 %

Tab. 6: Projevy potravinové alergie [25].

Postižený systém	Klinické příznaky
systémová reakce	anafylaktická reakce, anafylaktický šok
kožní projevy	orální alimentární syndrom, exantém, ekzém, uratika
gastrointestinální projevy	zvracení, průjem, gastroezofageální reflex, malabsorpce, enterorrhagie, obstrukce, abdominální koliky
dýchací cesty	kašel, dušnost, rýma
jiné	iritabilita, poruchy spánku



Obr.13: Rizikové faktory rozvoje atopického onemocnění [25]

2.7 Průzkum trhu s probiotiky pro děti

Naprostá většina probiotických a prebiotických preparátů v České republice je na trh uváděna jako potravinové doplňky, což značně zhoršuje přehlednost a kontrolovatelnost trhu oproti situaci, v níž by se jednalo o registrovaná léčiva [27]. Doplňky stravy – potraviní doplňky nejsou léčiva, i když je můžeme nakupovat v lékárnách. V České republice patří mezi potraviny spadající pod potravinovou legislativu (Zákon č. 110/1997 Sb., vyhláška č. 446/2004). Od obvyklých potravin se odlišují formou a obsahem vitamínů, minerálních látek nebo jiných látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem. Jsou vyráběny za účelem doplnění běžné stravy na úroveň pouze „příznivě ovlivňující zdravotní stav“ [28]. Nutno také odlišit výrobky, které sice nenesou přímo označení probiotikum, ale mají obsahovat „živé jogurtové kultury“ a podobně. Živé mikroorganismy sice obsahovat mohou, ale ty nejsou většinou přesně definovány a nemusí se jednat o mikroorganismy s požadovanými účinky a vlastnostmi. Bezpečnost léčby probiotiky je ve srovnání s jinými terapeutickými postupy ve stejných indikacích vysoká, riziko nežádoucích účinků velmi malé, což slibuje dobrou compliance ze strany pacienta [27].

Probiotika jsou doporučovány při prevenci a léčbě alergií a atopických onemocnění, vývoji zdravé střevní mikroflóry, odstranění zažívacích obtíží, na podporu imunity a rekonvalescenci po antibiotikách. Vyskytují se jak ve formě tuhé – tablety, žvýkácké tablety, žvýkačky, prášek, tak ve formě tekuté – kapky. Také si můžeme vybírat z preparátů českých i zahraničních výrobců. Cena se odvíjí od velikosti balení (počet tablet, objem, hmotnost), tak od složení. Přibližné ceny se pohybují od jednoho po několik set korun. Často se v probiotických preparátech nachází více kmenů bakterií mléčného kvašení, u takových preparátů také můžeme nalézt ve složení prebiotika (vláknina, inulín atd.). Výrobky bývají také často ochucovány, aby byly lépe přijímány dětmi. Tyto preparáty bývají většinou doporučovány od ukončeného 1. – 3. roku dítěte, lze ale nalézt i výrobky, které je možné podávat od ukončeného 1. měsíce, jedná se většinou o kapky. V příloze 2 jsou uvedeny některé vybrané preparáty, které jsou na českém trhu volně k dostání a Biopron obdrženy od firmy Valosun a.s.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

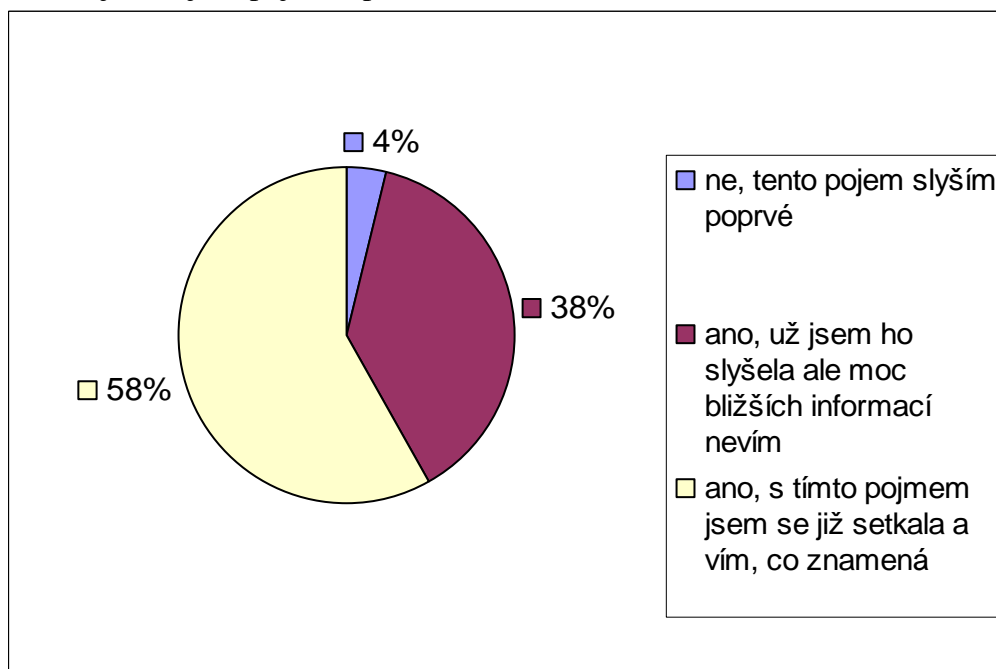
3.1 Zpracování dotazníkové studie zaměřující se na doplňky stravy pro děti obsahující probiotika

3.2 Výsledky a diskuze

Ve spolupráci s firmou Valosun a.s. byl vytvořen dotazník (příloha 1), jehož pomocí jsme chtěli zmapovat situaci na českém trhu s probiotiky pro děti. Do studie bylo zařazeno 50 náhodně vybraných žen, jenž byly těhotné nebo měly děti v předškolním věku. Tomuto vzorku populace byl předán dotazník spolu se vzorkem produktu od firmy Valosun a.s. Biopron JUNIOR, který byl testován na vhodnost použití pro děti. Dotazník obsahoval 22 otázek, které se zaměřovaly na zjištění informovanosti matek v tomto směru, na jejich zájem o tyto produkty, na postup selekce a priority při výběru probiotika, a to jak pro sebe tak pro dítě. Číslování grafů neodpovídá číslování a pořadí otázek, přeskupením pořadí otázek bylo dosaženo lepšího porovnání výsledků.

Z prvního grafu je patrné kolik dotazovaných žen je obeznámeno s pojmem probiotika a zda znají také jeho význam. Bylo zjištěno, že nadpoloviční většina žen - 58 % ho nejen slyšela ale také znají jeho obsah. Dále potom 38 % žen tento pojem slyšela ale bližší informace neví a pouze 4 % dotazovaných pojem probiotika neslyšela vůbec.

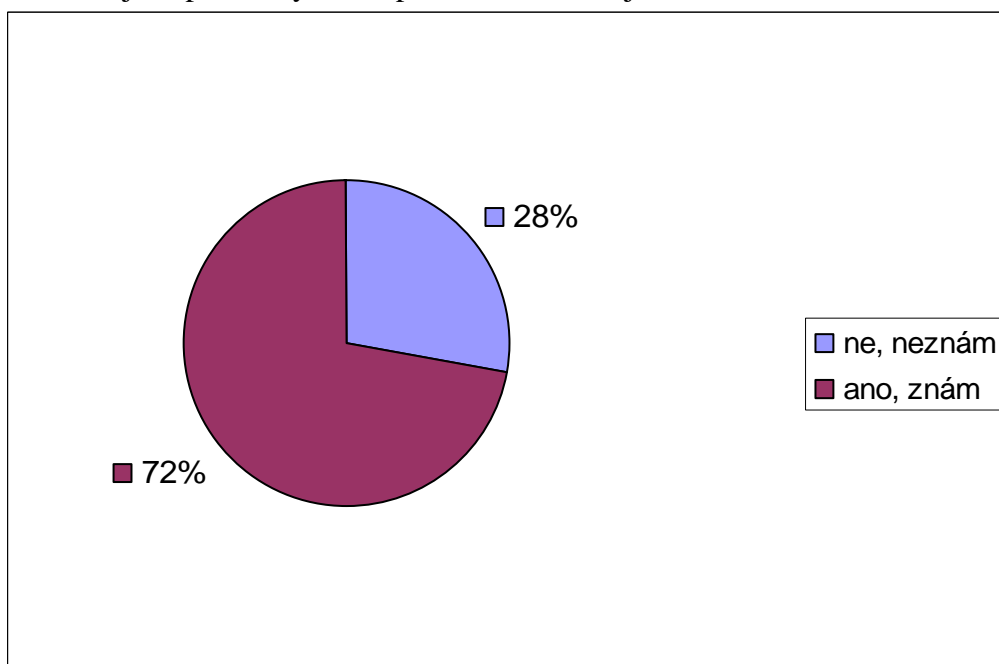
Graf 1: Setkali jste se již s pojmem probiotika?



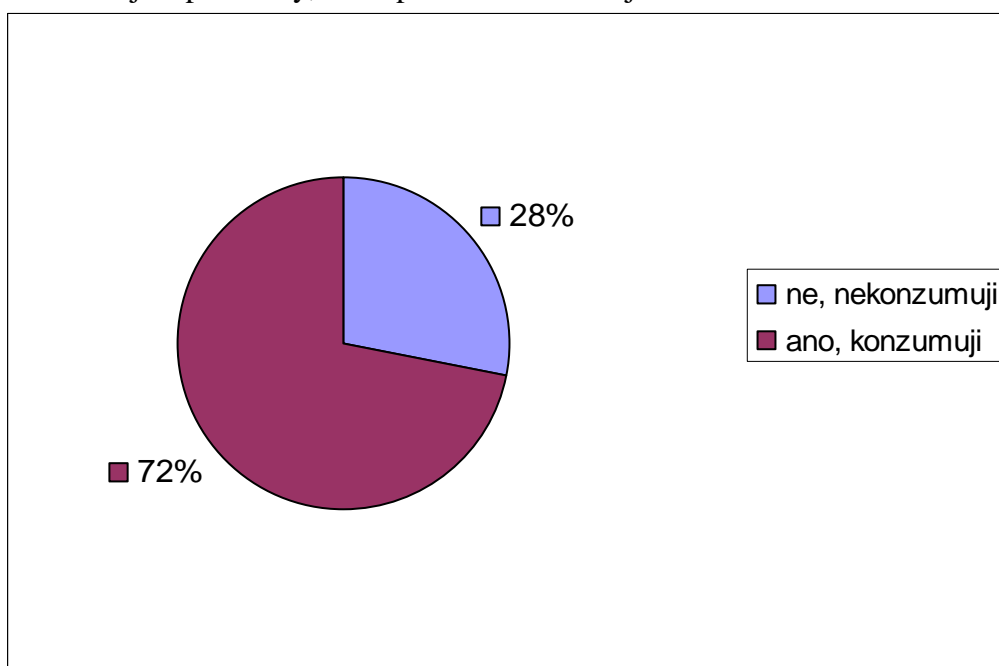
Zajímavé bylo zjištění, které vyplývá z grafů 2 a 3. Kde jsme se zajímali o to, zda ženy znají některé potraviny obsahující probiotika a zda potraviny obsahující probiotika konzumují. Z grafů je jasné patrné, že stejné procento žen – 72 %, které zná tyto potraviny zároveň i tyto potraviny konzumuje. Zbýlých 28 % dotazovaných žen potraviny s probiotiky nezná a nekonzumuje je. Tyto výsledky naznačují, že informovanost v oblasti výživy a probiotik má (může mít) výrazný vliv na konzumaci funkčních potravin a probiotik.

Pokud ženy potraviny s obsahem probiotik konzumují jedná se nejčastěji o jogurty, sýry, mléčné nápoje, kefíry apod.

Graf 2: Znáte nějaké potraviny, které probiotika obsahují?



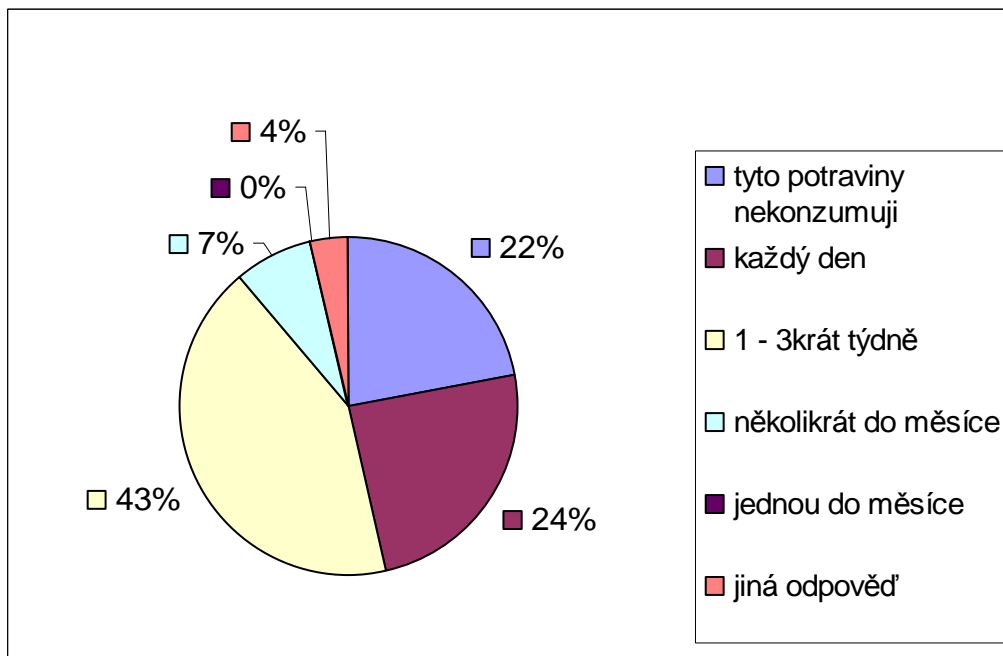
Graf 3: Konzumujete potraviny, které probiotika obsahují?



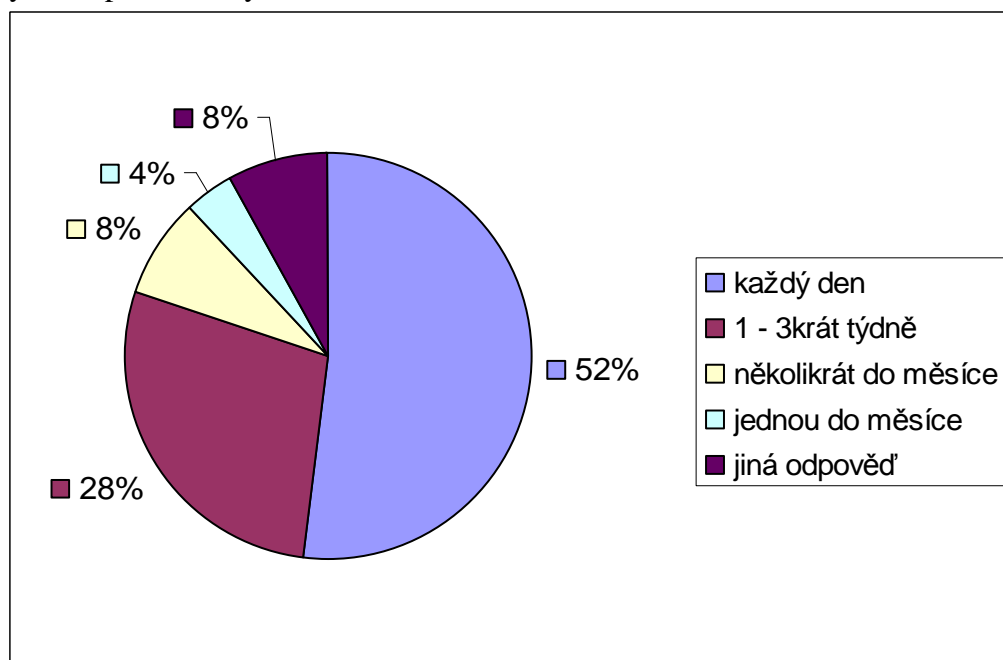
V odpovědích v grafech 4 a 5 lze pozorovat rozpor. 52 % dotazovaných (viz. v grafu č. 5) si myslí, že pro požadovaný účinek je potřebné probiotika konzumovat každý den. Ale zároveň v grafu 4 uvádí, že pokud tyto potraviny konzumují, tak je to nejčastěji - 43 % pouze 1-3 týdně a jen 24 % uvedlo, že je zařazuje do svého jídelníčku každý den. Celých 22 % tyto potraviny nejí vůbec. 7 % dotazovaných je konzumuje několikrát do měsíce

a 4 %, které zvolily jinou odpověď nejčastěji odpovídaly, že je do jídelníčku zařazují nepravidelně podle chuti. Z grafu 5 můžeme vypožorovat, že se ženy domnívají, že s prodlužováním intervalů mezi konzumací probiotik také klesá jejich účinek.

Graf 4: Pokud tyto potraviny konzumujete, jak často je zařazujete do svého jídelníčku?



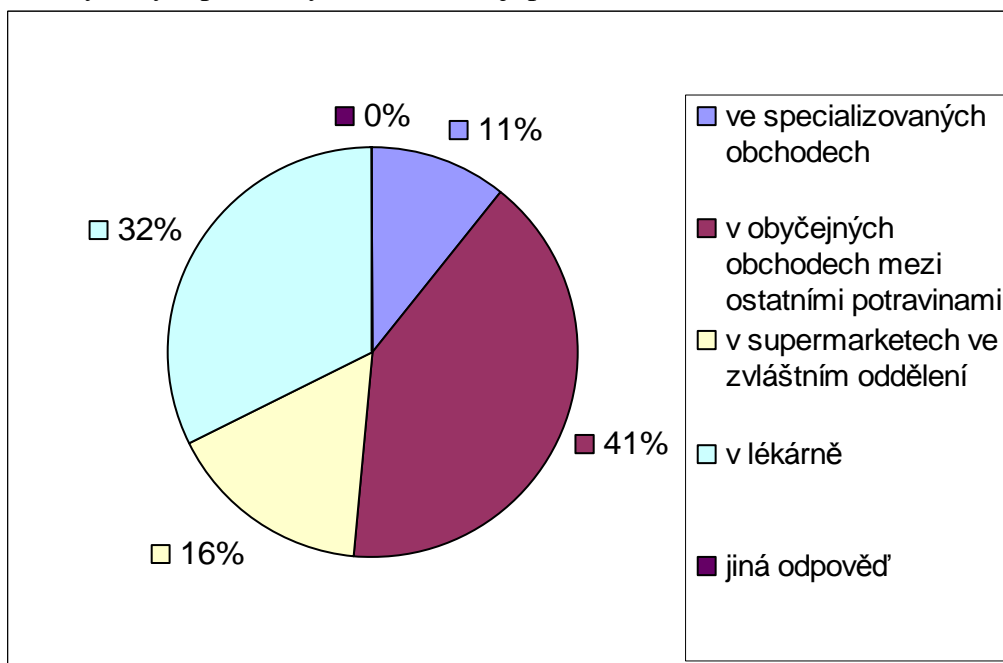
Graf 5: Jak často by podle Vás bylo vhodné užívat probiotika či probiotické preparáty, aby měly vámi požadovaný účinek?



Jak můžeme pozorovat v grafu 6, celých 41 % dotazovaných by potraviny s obsahem probiotik hledaly v obyčejných obchodech mezi ostatními potravinami, dále pak byly nejčastěji uváděny lékárny – 32 % a zvláštní oddělení v supermarketech 16 %. Z výsledků by

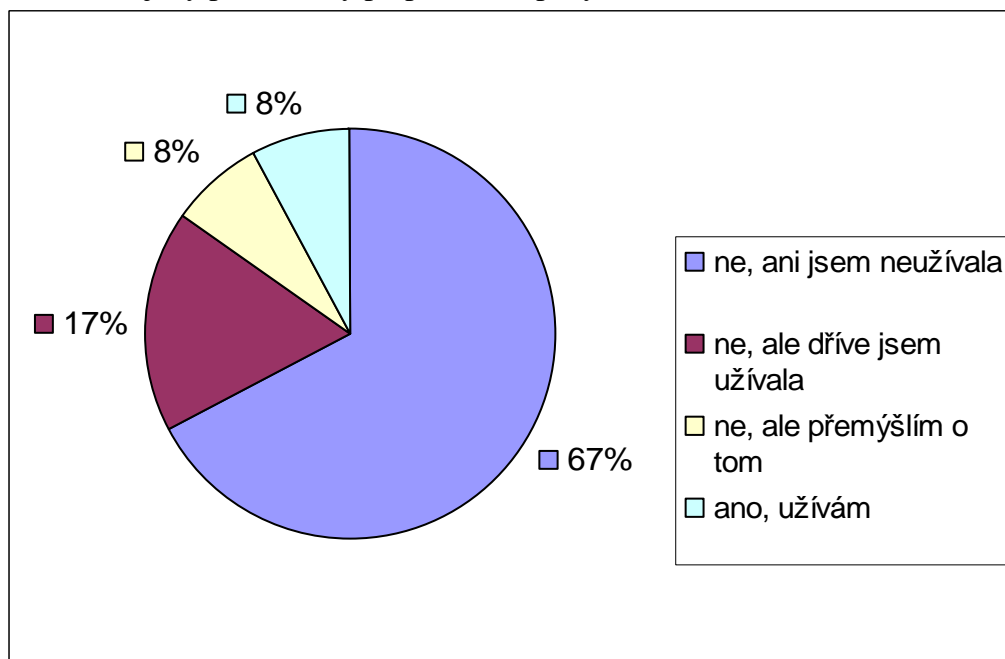
bylo možné vyvodit závěr, že pro prodejce by bylo nejvhodnější umístit potraviny s probiotiky do obyčejných obchodů, protože právě zde by je nejčastěji lidé hledali. Překvapivé může být procento žen očekávající nabídku těchto potravin v lékárně.

Graf 6: Kde byste tyto potraviny, které obsahují probiotika, hledali?

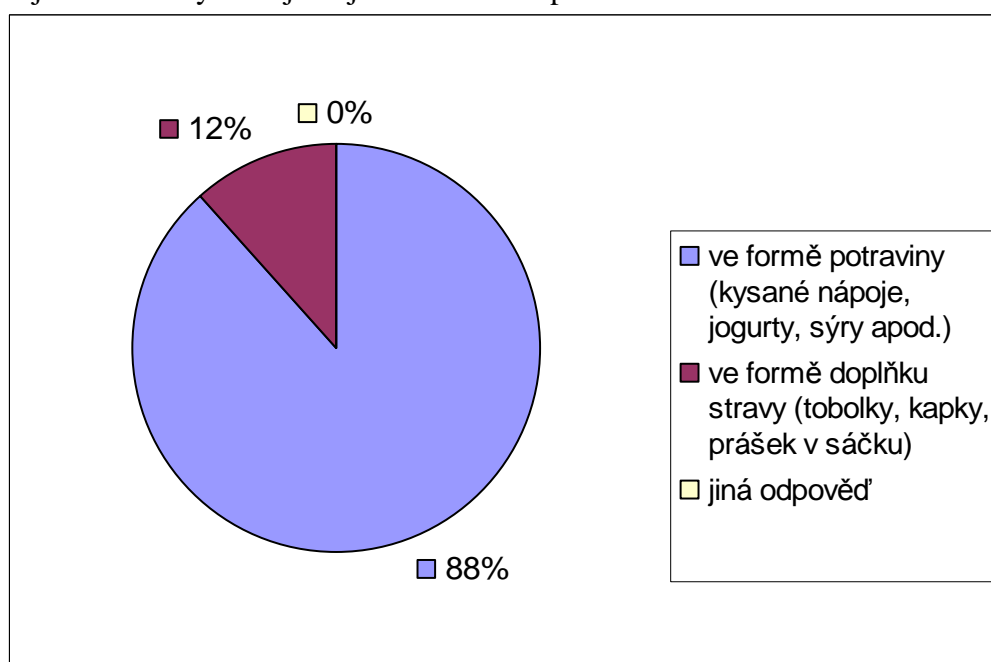


Závěry vyvozené z grafů 7 a 8 poukazují na velkou preferenci žen konzumovat probiotika ve formě potravin oproti užívání probiotik ve formě probiotických preparátů (koupené v lékárně). Takto odpovědělo na příslušnou otázku 88 % žen, tomuto procentu přibližně odpovídá i 67 % žen, které nikdy neužívaly probiotický preparát koupený v lékárně, což je patrně způsobeno právě jejich preferencí potravin před doplňky stravy. 17 % žen dříve probiotický preparát užívalo a jen 8 % o tom uvažuje.

Graf 7: Užíváte nějaký probiotický preparát (koupený v lékárně) ?

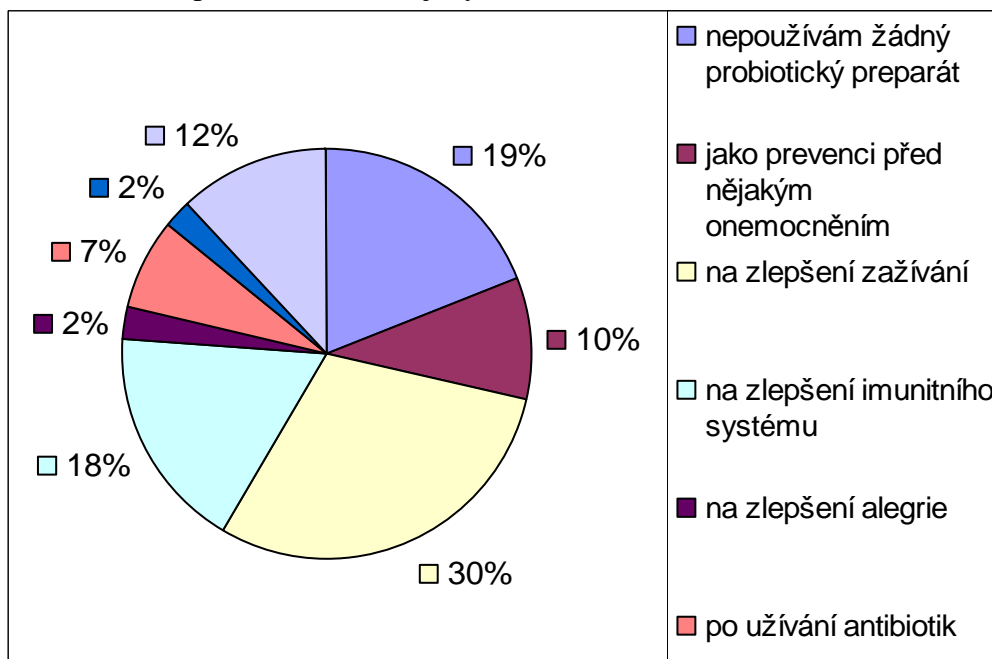


Graf 8: V jaké formě byste nejraději konzumovali probiotika?



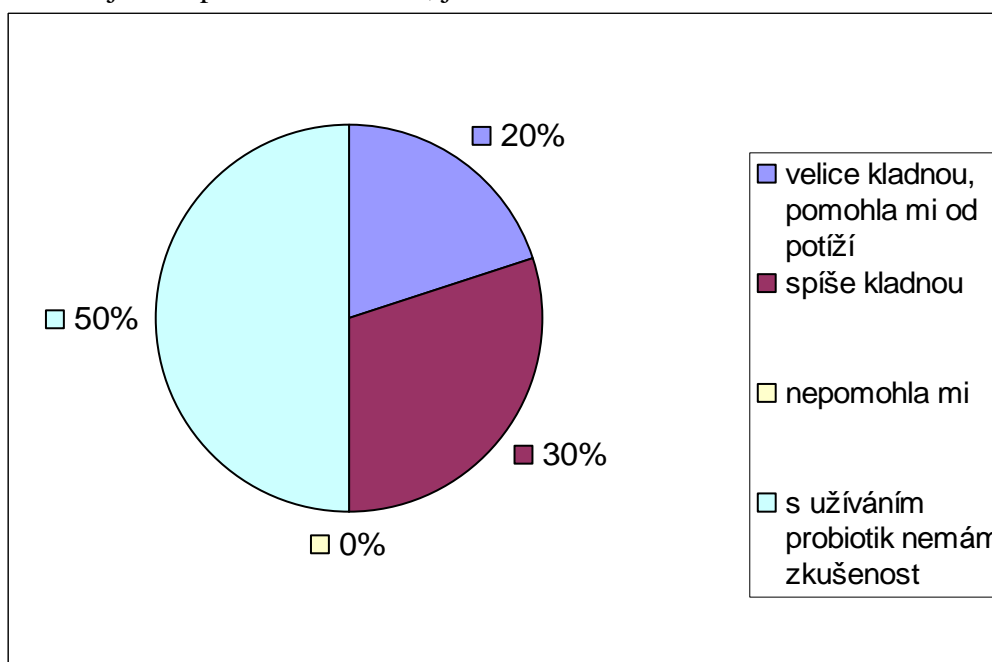
Také nás zajímalo, za jakým účelem jsou probiotika užívána. 19 % žen probiotický preparát neužívá. Pokud ženy preparát užívaly, nejčastějšími odpověďmi byly zažívací obtíže – 30 %, zlepšení imunitního systému – 18 % a 12 % zvolilo jinou odpověď, přičemž nejčastěji ženy uváděly jako důvod chuť potravin, těhotenství a kojení. Zbytek procent byl rozptýlen v dalších možnostech.

Graf 9: Pokud užíváte probiotika, tak za jakým účelem?



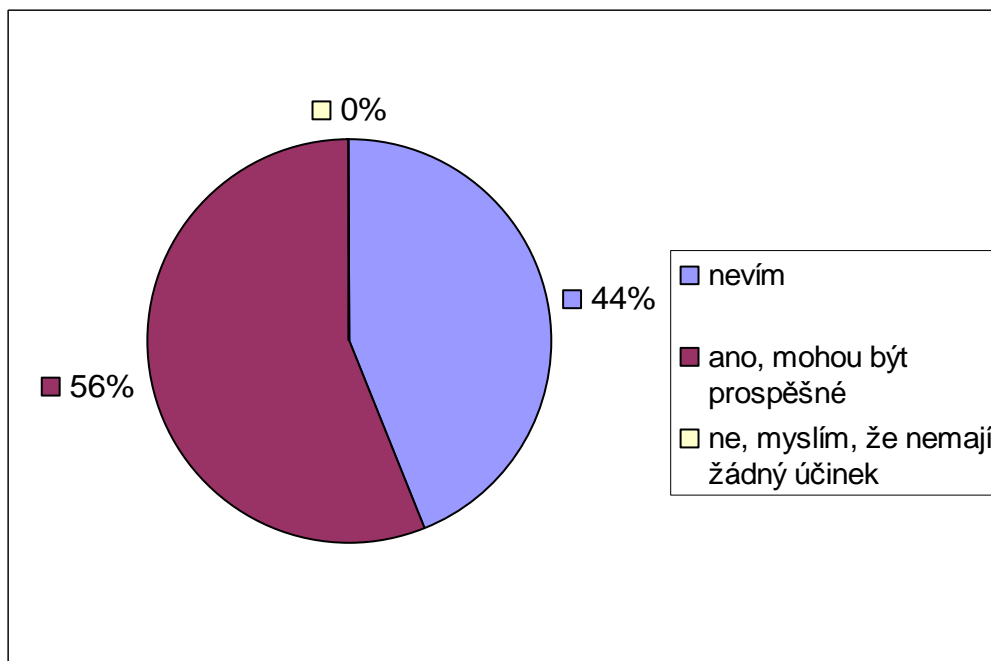
V grafu 10 pozorujeme, že přesně polovina – 50 % dotazovaných žen nemá s probiotiky zkušenost, což si odporuje s odpověďmi v grafech 3 (72 % konzumuje potraviny s obsahem probiotik), 4 (zde pouze 22 % uvedlo, že nekonzumuje potraviny s obsahem probiotik) a 9 (pouze 19 % neužívalo žádný probiotický preparát). Z toho vyplývá, že ženy nemají zcela jasno v definici probiotik a nejsou v tomto ohledu příliš informované. Druhá polovina s nimi má spíše kladnou zkušenost, z toho celých 20 % uvádí, že tato zkušenost byla velice kladná a probiotika jim pomohla od potíží. Žádná z dotazovaných žen neuvedla, že by ji nepomohly. Z výsledků je patrné, že pokud žena probiotika užívala, má s nimi pouze kladnou zkušenost.

Graf 10: Pokud jste už probiotika užívali, jakou s nimi máte zkušenost?



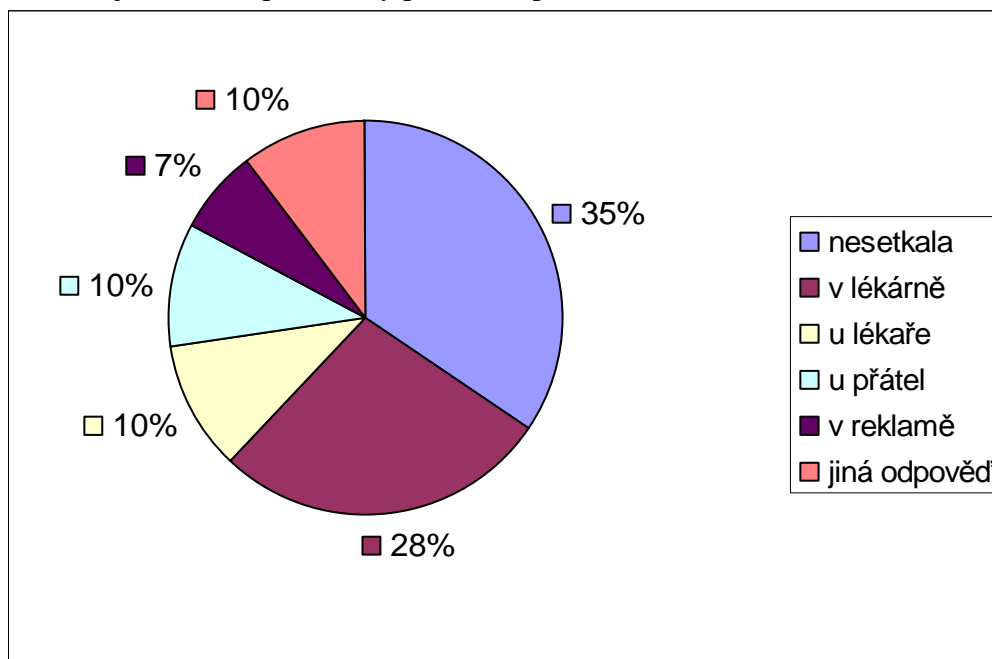
Zajímalo nás zda ženy pokládají za prospěšné užívání probiotik v těhotenství. 56 % se domnívá, že mohou být prospěšné ale výrazné procento – 44 % žen neví, zda mohou být po dobou těhotenství něčím přínosné. V těchto odpovědích vidíme rozpolcenost a spíše nejistotu ve volbě odpovědi plynoucí z neinformovanosti v tomto směru. Žádná z žen se nedomnívá, že nemají žádný účinek.

Graf 11: Myslíte si, že je dobré probiotika užívat i v těhotenství?



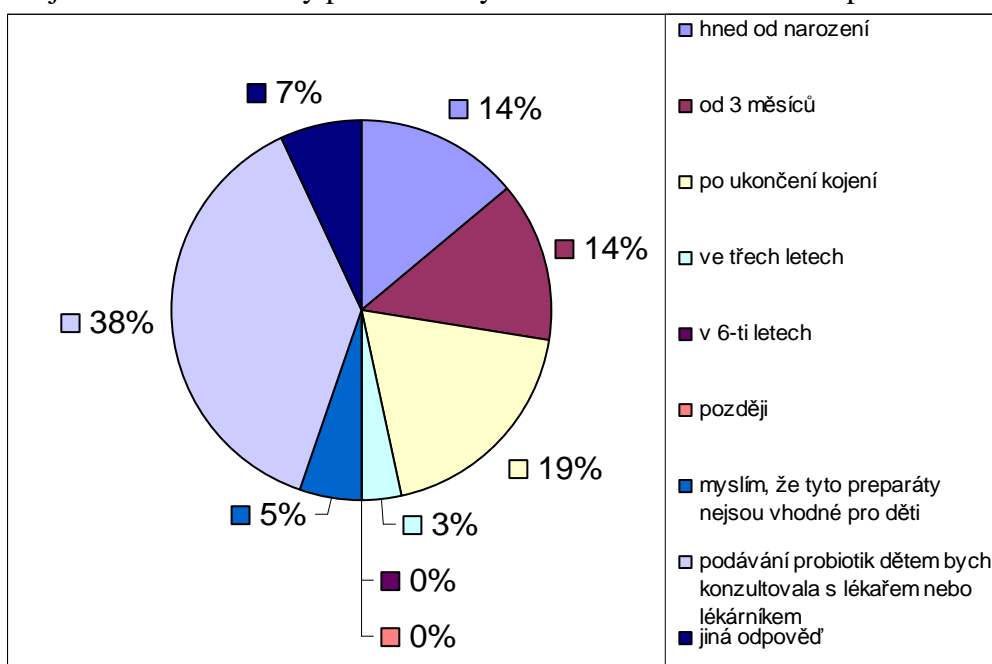
V další části dotazníku se otázky zaměřily na probiotika v souvislosti s užíváním dětmi. Nejvyšší zastoupené procento – 35 % žen se s probiotiky pro děti vůbec nesetkaly a neví, kde je hledat. 28 % žen správně tuší, že je naleznou v lékárně. Dalších 30 % se rovnoměrně rozložilo mezi ostatní možnosti: 10 % dotazovaných se s nimi setkaly u lékaře, 10 % u přátel a 10 % žen se s nimi setkalo právě v jogurtech a dalších mléčných výrobcích.

Graf 12: Setkali jste se už s probiotiky pro děti a pokud ano kde?



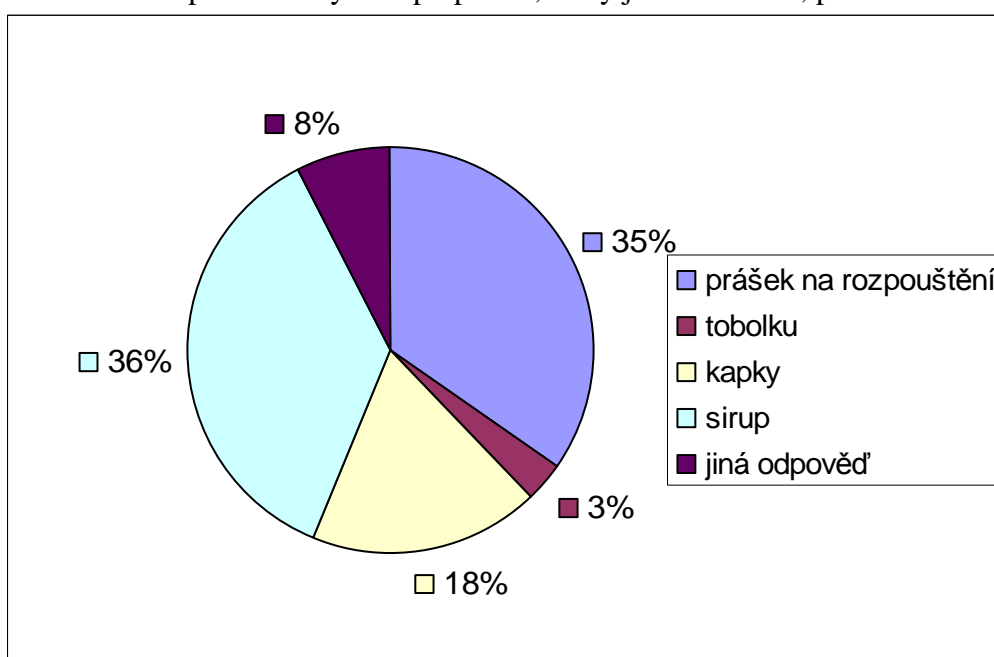
Většina dotazovaných žen zastává názor, že je vhodné začít s podáváním probiotik dětem již od útlého věku. 19 % si myslí, že je vhodné začít s užíváním po ukončení kojení, 14 % hned od narození a dalších 14 % od 3 měsíců. 38 % žen odpovědělo, že by tento krok nejdříve konzultovaly s lékařem nebo lékárníkem. Zde je vidět, že ženy si nejsou jisté vhodností užívání probiotik dětmi. U rozhodnutí týkajících se dětí jsou ženy opatrnější a rozvážnější, než u rozhodnutí ve stravování a výživě jich samotných.

Graf 13: V jakém věku dítěte by podle Vás bylo vhodné začít s užíváním probiotik?

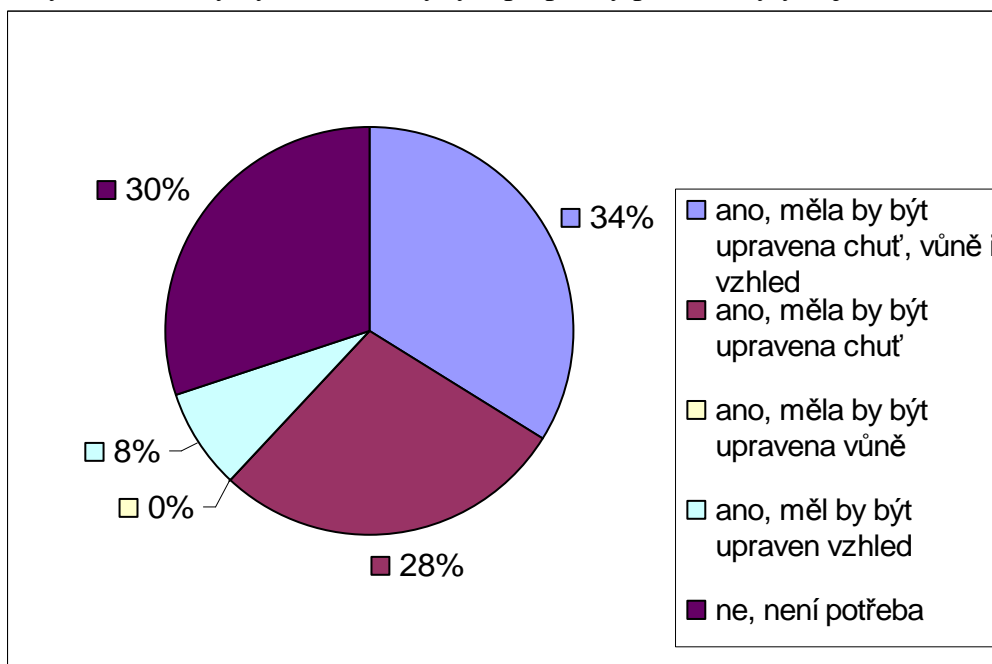


V druhé polovině dotazníků nás také zajímalo, jak by si ženy představovaly preparát pro své dítě. Zaměřili jsme se hlavně na formu a chuťovou a senzorickou úpravu. V grafu 14 vidíme, že nejpreferovanější formou probiotického preparátu jsou s 36 % sirup a s 35 % prášek na rozpouštění, další nejpočetnější zvolenou skupinou byly kapky – 18 %. Volba sirupu a prášku na rozpouštění je patrně dána snadnou aplikovatelností a snadným podáním dítěti, které probiotikum v takové formě přijme lépe než ve formě tobolky, kterou zvolily jen 3 % žen. I v grafu 15 pozorujeme tendenci žen, zvolit výrobek co nejpříjemnější pro dítě. Proto by 34 % žen zvolilo preparát, který by měl upravenou jak chuť, vůně i vzhled. Dalších 28 % by preferovaly preparát s upravenou chutí. Závěrem tedy lze říci, že pro ženu jako matku je důležitá nejen forma preparátu ale také jeho úprava, která by měla nejvíce vyhovovat dítěti.

Graf 14: Jakou formu probiotik byste u preparátu, který je určen dítěti, preferovali?

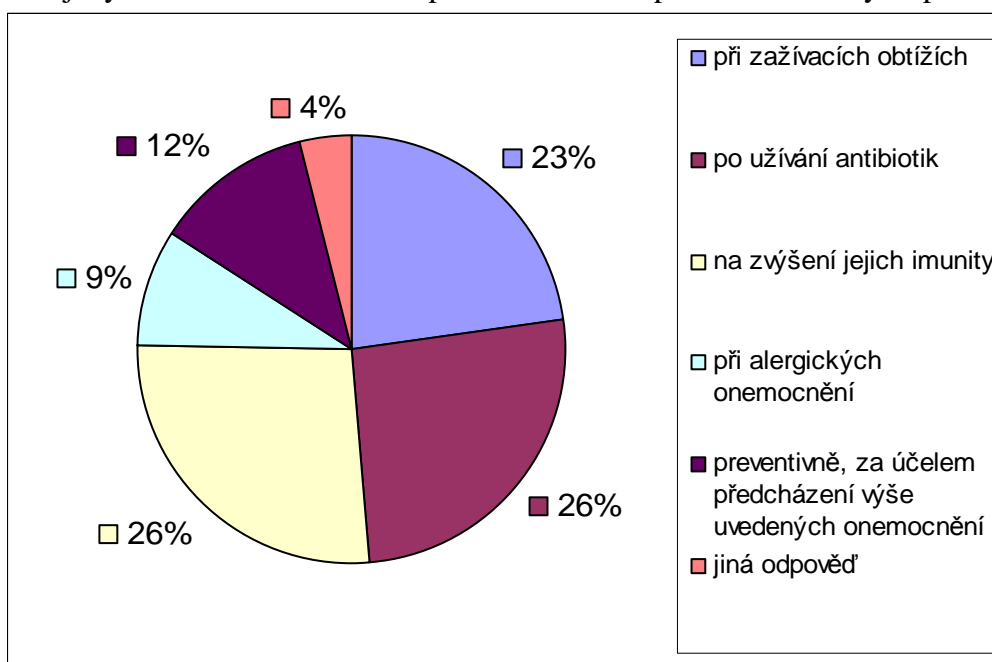


Graf 15: Myslíte si, že by bylo dobré, aby tyto preparáty pro děti byly nějak dochuceny?



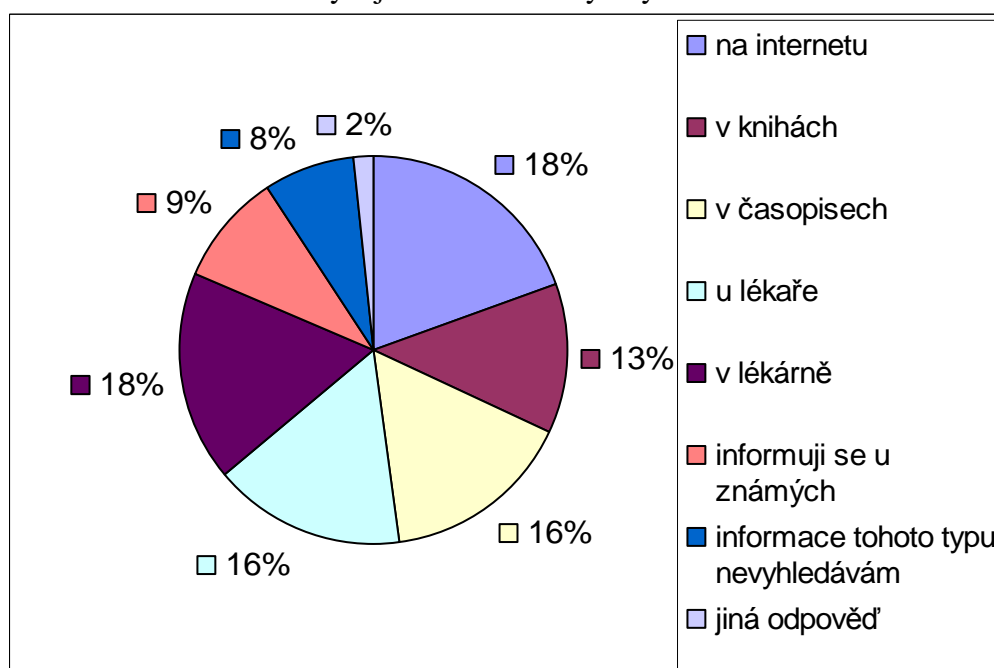
Z odpovědí zpracovaných v grafu 16 jsme zjišťovali za jakým účelem matky podávají nebo by podávali probiotika dětem. Nejčastějšími odpověďmi byly s 26 % na potíže způsobené užíváním antibiotik, s 26 % na zvýšení imunity a s 23 % na potíže se zažíváním. Tady můžeme pozorovat některé rozdíly s odpověďmi zpracovanými v grafu 9, kde jsme se dotazovali za jakým účelem užívají probiotika samy matky, které je nejčastěji užívají na zažívací obtíže. V grafu 9 by jen 7 % žen užívalo nebo užívá kvůli problémům způsobených antibiotiky. U dětí by ale tuto terapii probiotiky volilo celých 26 %.

Graf 16: Při jakých zdravotních obtížích probiotika dětem podáváte nebo byste podávali?

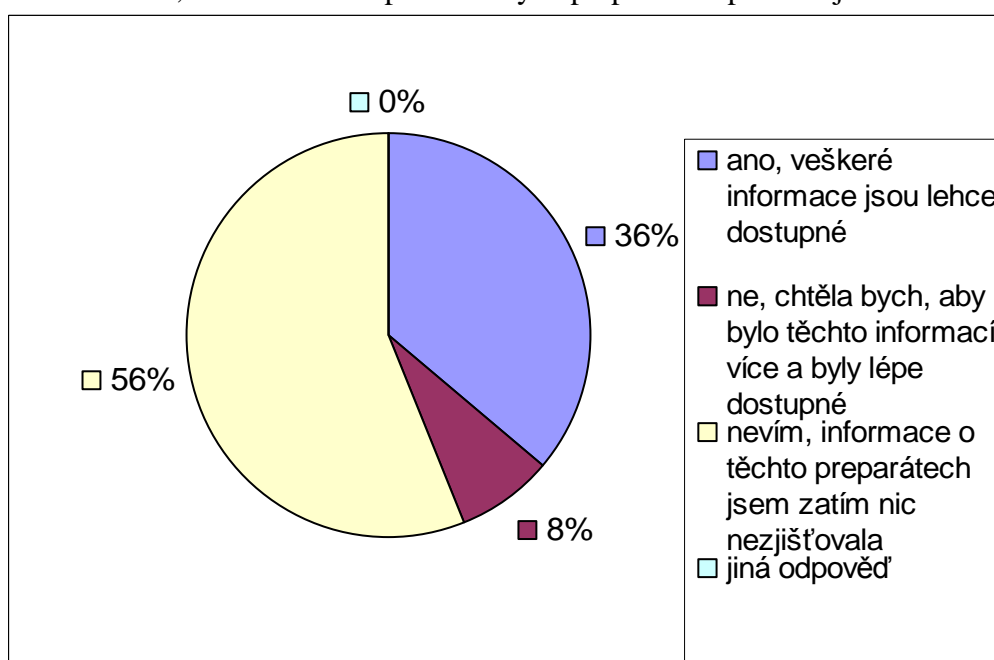


17. a 18 otázka se zaměřovala na průzkum informovanosti a dosažitelnosti informací týkajících se probiotik a celkově zdraví a výživy. V grafu 18 můžeme vyčíst, že víc jak polovina žen – 56 % tyto informace nevyhledává a 36 % si myslí, že tyto informace jsou lehce dostupné. Vysoké procento žen, které si nehledá tyto informace, poukazuje na jistý nezájem o tuto problematiku. V grafu 17 jsou pak celkem rovnoměrně rozloženy procenta na všechny procenta, z toho můžeme soudit, že ženy, které tyto informace hledají, využívají všechny dostupné zdroje informací.

Graf 17: Kde hledáte informace týkající se zdraví a výživy?

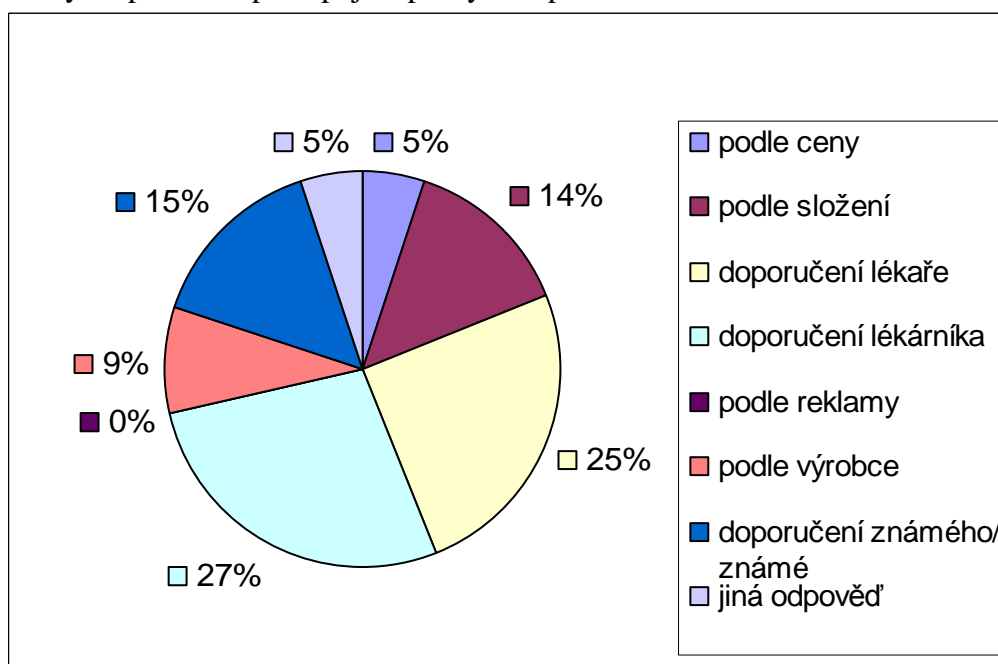


Graf 18: Zdá se Vám, že informací o probiotických preparátech pro děti je dostatek?



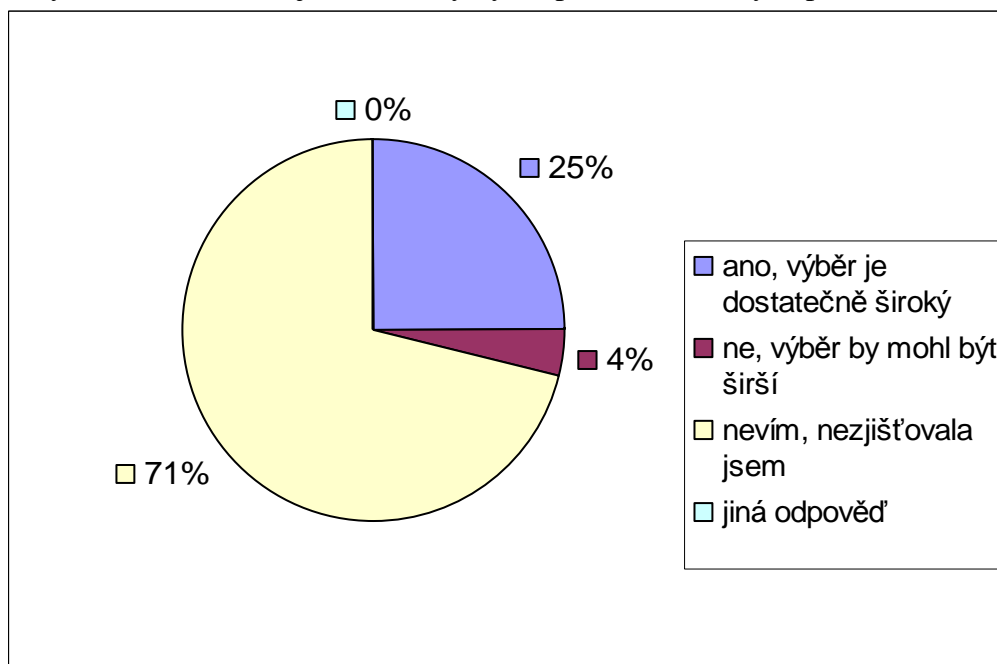
Důležitou složkou prodeje probiotických preparátů je i informace o způsobu a postupu při výběru probiotika danou skupinou lidí. Proto nás i toto v našem dotazníku zajímalo. 27 % dbá na radu a doporučení lékárníka a 25 % dá na radu lékaře, celkově si tedy 52 % dotazovaných žen nechá poradit od odborníka, kterému důvěřuje a řídí se jeho radou při nákupu probiotického preparátu. 15 % dá na radu známého či známé a pouze 14 % řídí svůj výběr podle složení výrobku a 9 % podle výrobce. Překvapivým zjištěním je, že pouze 5 % žen se rozhoduje podle ceny a ani jedna žena neuvedla, že by ji při výběru ovlivnila reklama. Poslední zmíněné je zajímavé, protože dnešní doba je charakteristická masivní reklamou, na kterou dbají i firmy podnikající ve zdravotnictví, výživě a potravinových doplňků.

Graf 19: Jakým způsobem postupujete při výběru probiotik?



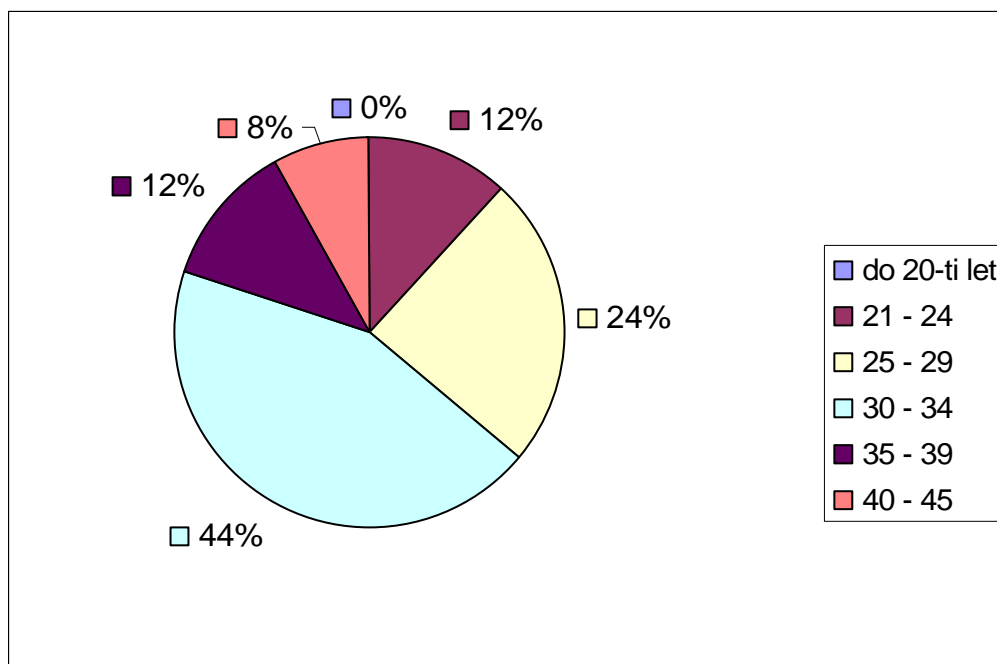
Jednou z posledních získaných informací bylo, že 71 % žen neví a nezjišťovalo, zda je na trhu dostatečně široký výběr probiotik pro děti, 25 % si pak myslí, že ano a jen 4 % si myslí, že ne. Je jasné, že ženy mají patrně základní informace o probiotících, ale tyto informace nejsou nijak rozsáhlé a vesměs jsou spíše jen orientační.

Graf 20: Myslíte si, že na trhu je dostatečný výběr probiotik určených pro děti?

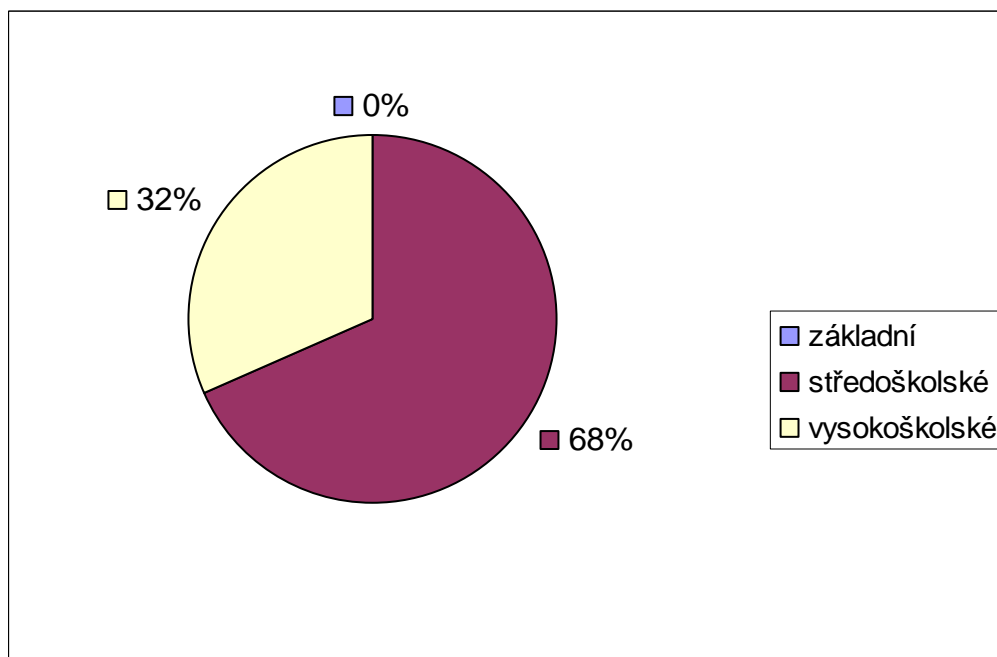


Poslední otázky byly cíleny na zjištění sociologického zařazení vybrané skupiny. Podle výsledků z grafu 21 můžeme říci, že téměř polovina žen (44%) spadá do věkové alegorie 30 - 34 let a druhou nejpočetnější skupinou byly ženy ve věku 25 -29 let (24 %). Co se týkalo vzdělání, tak téměř dvě třetiny žen (68 %) měly středoškolské vzdělání a zbytek tvořily ženy s vysokoškolským vzděláním – 32 %.

Graf 21: Váš věk



Graf 22: Vzdělání



Z vyhodnocení výsledků dotazníkové studie vyplývá, že námi testovaný produkt Biopron JUNIOR je schopný obstát na trhu s probiotiky pro děti. Jeho výrazným kladem je jeho forma (sypký prášek), kterou matky preferují. Forma prášku je dětmi velmi kladně přijímaná, snadno se suspenduje v tekutině a děti tedy nemají problém s jeho konzumací. Lepší formou už se jeví pouze kapky či sirup. Je důležité zdůraznit, že matky také velmi výrazně preferují senzorické úpravy těchto produktů, jedná se zejména o chuť, vůni a barvu. Tyto úpravy jsou důležité ze stejného důvodu jako forma probiotika a to je právě kladné přijetí dítětem.

Pokud bychom měli celkově vyhodnotit skupinu dotazovaných žen, pak by se jednalo o ženu ve věku mezi 30 až 34 lety, která se již setkala s pojmem probiotika a ví co znamená. Probiotické potraviny konzumuje 1-3 týdně a nejraději volí formu potraviny s obsahem probiotik, které by hledala v obyčejném obchodě. Očekává od nich zlepšení zažívání, imunitního systému a užívá je jako prevenci před nějakým onemocněním. Pokud probiotika užívá, má s nimi kladnou zkušenost. Probiotické preparáty v lékárně nenakupuje. Tato žena příliš nevyhledává informace k této problematice a to ani ke vztahu k dětem a před zahájením užívání probiotik u dítěte by se nejdříve poradila s lékařem nebo lékárníkem. Pokud se žena rozhodne dítěti tyto preparáty podávat předpokládá zlepšení zažívání, zvýšení imunity dítěte a tyto preparáty dítěti podává při obtížích způsobené léčbou antibiotiky. Od těchto preparátů určených pro děti očekává, že budou dochuceny a preferuje je formou sirupu nebo prášku na rozpouštění.

3.3 Kultivace bakterií rodu *Lactobacillus* ze zakoupených probiotických preparátů

Cílem této praktické části, bylo zjistit počet životaschopných mikroorganismů, které se nacházejí ve vybraných probiotických preparátech pro děti. Zaměřili jsme se na bakterie rodu *Lactobacillus*, které jsme se pokusili kultivovat na dvou různých půdách (M.R.S AGAR a Tomato Juice Medium Base – pro laktobacily ve víně) a to jak v prostředí aerobním i anaerobním, teplota kultivace v obou případech byla 37 °C.

Pomůcky:

- sterilní zkumavky se zátkami
- stojan na zkumavky
- lihová fixa na popisování skla
- sterilní Petriho misky
- sterilní pipeta 10 ml
- balónek na pipetu
- mikropipeta
- špičky 1 ml a 0,05 ml
- sterilní hokejka
- sterilní klička
- sterilní Erlenmayerova baňka 100 ml a 50 ml
- podložní sklíčka
- krycí sklíčka
- mikroskop
- kádinka na odpad

Chemikálie:

- sterilní voda
- M.R.S. AGAR, 500 g/8 l, pH 6,2 ± 0,2 při 25 °C, složení: pepton 10,0 g/l; Lab-Lemco Power 8,0 g/l; kvasnicový extrakt 4,0 g/l; glukóza 20,0 g/l; Tween 80 g/l 1 ml; dihydrogen fosforečnan draselný 2,0 g/l; 3·H₂O trihydrát octanu sodného 5,0 g/l; citrát amonný 2,0 g/l; heptahydrát síranu hořečnatého 0,2 g/l; tetrahydrát síranu manganatého 0,05 g/l
- Tomato Juice Medium Base (pro laktobacily ve víně), 40 g/1000 ml, pH 5,0 ± 0,2 při 25 °C, složení: pepton speciál 5,0 g/l; kvasnicový extrakt 5,0 g/l; dextróza 10,0 g/l; fosforečnan draselný 0,5 g/l; chlorid sodný 0,125 g/l; chlorid vápenatý 0,125 g/l; chlorid sodný 0,125 g/l; síran hořečnatý 0,12 g/l; síran manganatý 0,03 g/l; bromkresolová zeleň 0,03 g/l; lyofylizovaný rajčatový džus 150,0 g/l; Agar 15,0 g/l
- Lactobacilli suplement
- imerzní olej
- vzorky produktů Biopron JUNIOR, Probian mimi, Biopron 9, Lacidofil, Nutrolin-B

Postup:

1. Příprava živných půd

- podle údajů na obalu bylo smícháno předepsané množství sušeného živného média (M.R.S agar nebo Tomato Juice Medium Base) a sterilní vody, tak aby byl připraven dostatečný objem živného média na jednu sadu pokusu (12 + 12 Petriho misek)
- připravené živné médium bylo sterilizováno ($120^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$) a rozlito do sterilních Petriho misek, vždy jsme měli na jeden pokus 12 misek s M.R.S agarem a 12 misek s Tomato Juice Medium Base (pro laktobacily ve víně)
- před rozlitím M.R.S agaru do Petriho misek bylo nutné do něj přimíchat 1 ml Lactobacilli suplementu na 100 ml M.R.S. agaru, suplement byl připraven tak, že 1 dávka prášku Lactobacilli suplementu (sterilní ampule) byla rozpuštěna v 5 ml sterilní vody

2. Příprava vzorku

- daný probiotický preparát byl rozpuštěn v 50 ml sterilní vody a s takto připraveným roztokem bylo provedeno desítkové ředění (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6})
- pokud byl preparát v kapalně formě, odpipetoval se 1 ml vzorku rovnou ze vzorku a opět se provedlo desítkové ředění

3. Kultivace

- nachystané Petriho misky byly očkované 0,05 ml (popřípadě 0,02 ml) ředěným roztokem vzorku následujícím způsobem: vždy 4 misky jedním ředěním (2krát M.R.S. AGAR + 2krát Tomato Juice Medium Base)
- z každého ředění byly dvě misky kultivovány anaerobně a dvě aerobně (1krát M.R.S. AGAR + 1krát Tomato Juice Medium Base)
- kultivace probíhala vždy 3 – 5 dní při konstantní teplotě 37°C
- po uplynutí dané doby byly spočítány kolonie a vypočítán počet životaschopných mikroorganismů v analyzovaném vzorku probiotika [29]

3.3.1 Výsledky a diskuze

Ve všech vzorcích probiotických preparátů se nám podařilo prokázat kultivací přítomnost bakterií mléčného kvašení. Po kultivaci byl vždy spočítán počet narostlých kolonií a pomocí výpočtu byl zjištěn celkový počet životaschopných bakterií v daném množství, či objemu preparátu (Tab. 9). Vybrané preparáty byly pozorovány pod mikroskopem a byly z nich pořízeny fotografie. Viz. příloha 5.

Tab. 9: Objem či množství preparátu použité na kultivaci

<i>Produkt</i>	<i>Množství použité na kultivaci</i>
Biopron JUNIOR	1 sáček
Probian mimi	1 sáček
Lacidofil	1 tableta
Biopron 9	1 tableta
Nutrolin-B	1 ml

Příklad výpočtu:

- 50 µl: objem odpipetovaný z příslušného ředění na Petriho misku
- 50 ml: objem sterilní vody, ve kterém byla rozsuspendována jedna dávka probiotického preparátu
- 7 MO: počet mikroorganismů narostlých na Petriho misce v daném ředění
- 10^{-6} : použité ředění

$$x = \frac{50 \cdot 7 \cdot 10^6}{0,05} = \underline{7 \cdot 10^8 \text{ KTJ}}$$

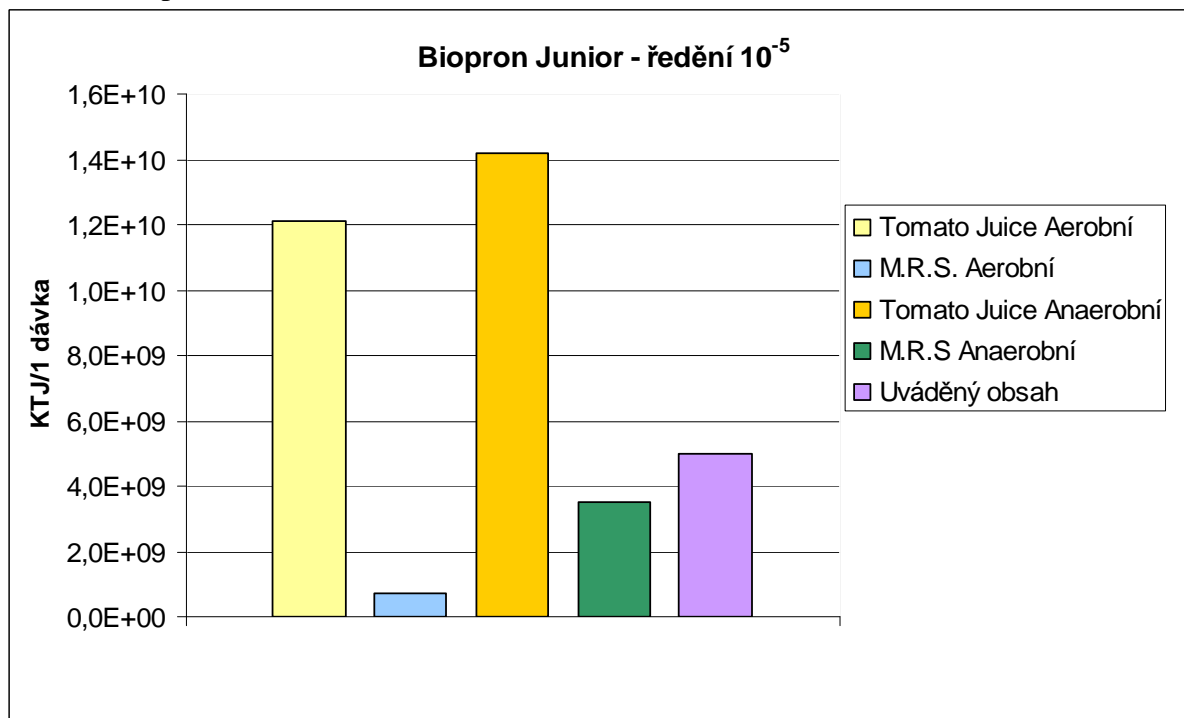
Veškeré výsledky výpočtů u jednotlivých produktů byly shrnuty do dvou tabulek (Tab. 10 a Tab. 11), které lze nalézt v příloze 4.

Výsledky z kultivací byly také přehledně shrnuty v grafech. V každém grafu jsou uvedeny vždy výsledky z kultivace jednoho produktu z 1 dávky (definice 1 dávky použité na měření viz. Tab. 12). Pro porovnání lze také v grafu nalézt fialový sloupec, který odpovídá hodnotě obsahu probiotických bakterií uvedeném výrobcem daného probiotického preparátu. Na vytvoření grafu se vybralo vždy ředění, ve kterém narostlo relevantní množství bakterií (20-200).

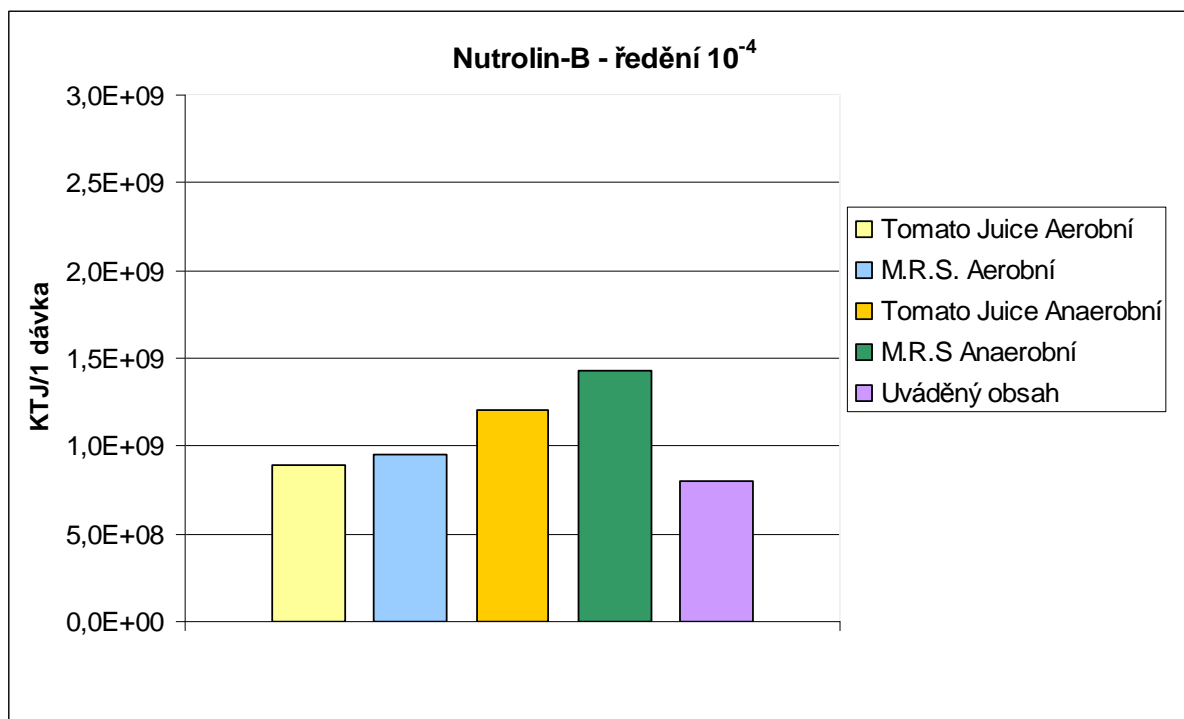
Tab. 12: Určení množství a formy 1 dávky u vybraných produktů

<i>Produkt</i>	<i>1 dávka produktu</i> (použitá na měření)	<i>Počet dávek za den</i>
Biopron JUNIOR	sáček	1
Probian mimi	sáček	1
Biopron 9	tableta	2 x 1
Lacidofil	tableta	1
Nutrolin-B	1 ml	2 x 5 ml

Graf 23: Biopron JUNIOR – ředění 10^{-5}



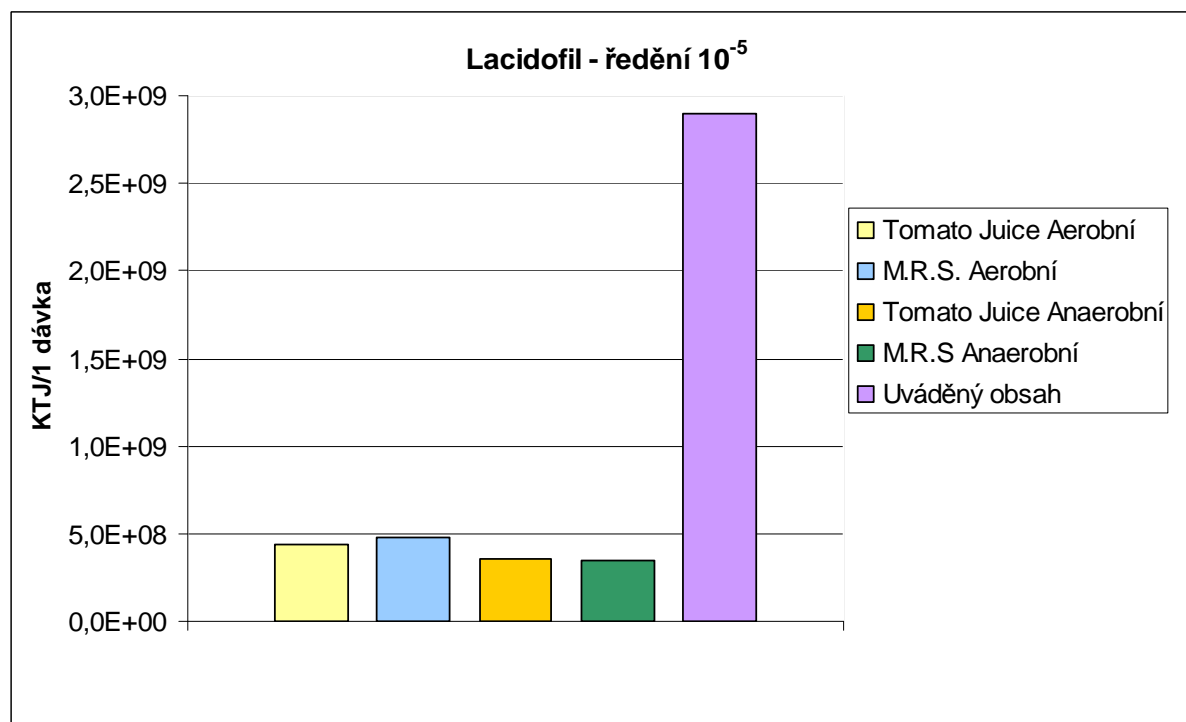
Graf 24: Nutrolin-B – ředění 10^{-4}



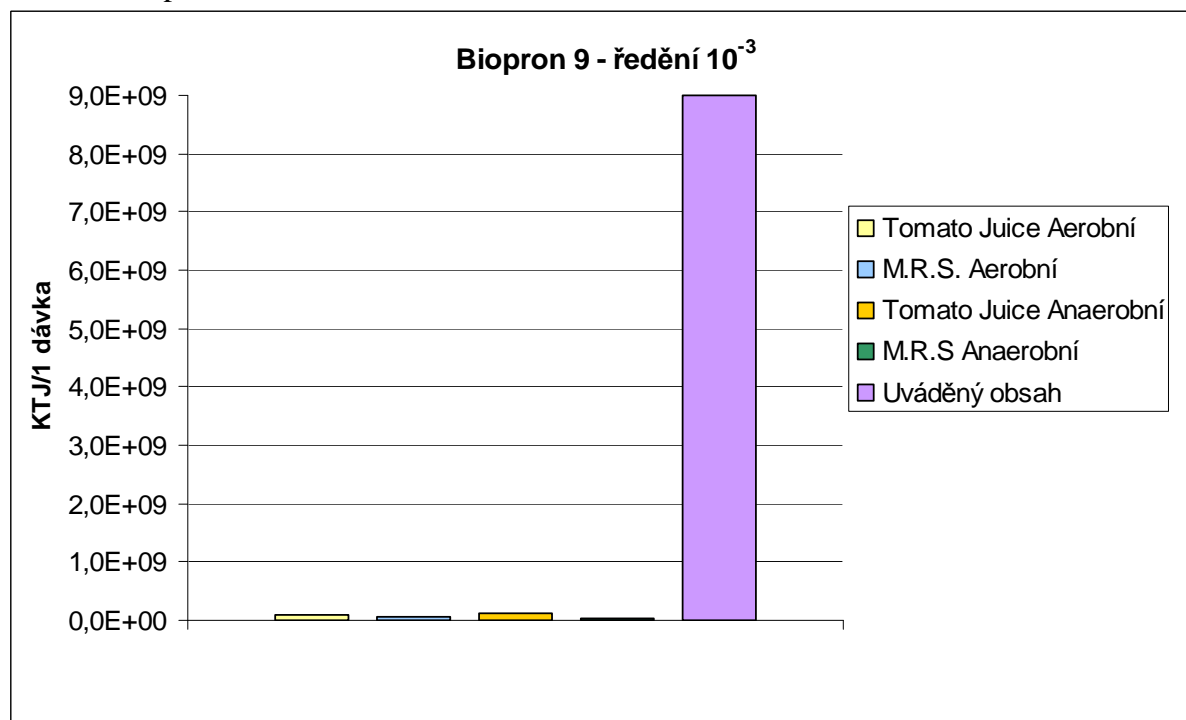
Biopron Junior a Nutrolin-B jako jediné z produktů podle kultivace obsahovaly více bakterií než deklaroval výrobce. Z grafu lze vyčíst, že nejvhodnější podmínky pro růst bakterií pro produkt Biopron JUNIOR se jeví Tomato Juice agar. Dále je také patrné, že více bakterií narostlo při anaerobní kultivaci. Preference anaerobní kultivace je společným znakem i pro produkt Nutrolin-B. Bakteriím mléčného kvašení v tomto produktu se ale lépe dařilo

na M.R.S. agaru. Je nutné zdůraznit, že pouze tyto dva produkty vykazovaly lepší výsledky kultivace (vyšší počty kolonií) v anaerobním prostředí než aerobním. Naším předpokladem totiž bylo, že probiotické bakterie obsažené v preparátech jsou uzpůsobeny na prostředí zažívacího traktu, v němž je anaerobní prostředí.

Graf 25: Lacidofil – ředění 10^{-5}

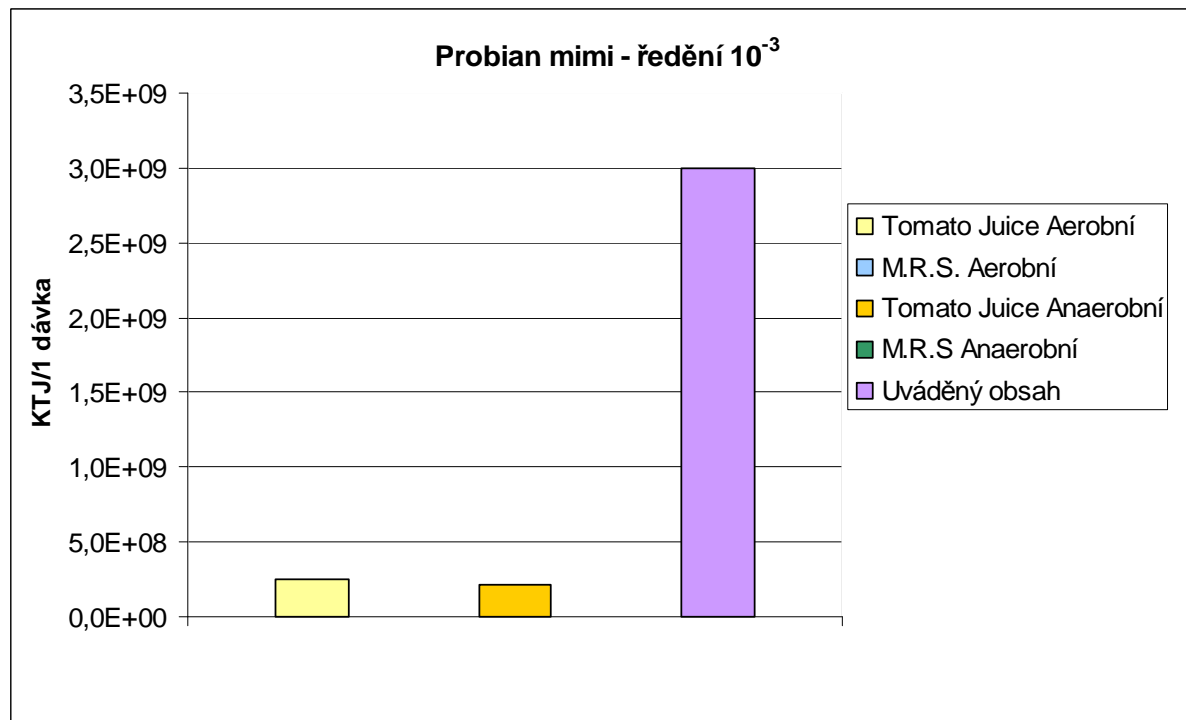


Graf 26: Biopron 9 – ředění 10^{-3}



U *Lacidofilu* i *Biopronu 9* můžeme pozorovat, že počet nakultivovaných bakterií je výrazně nižší než je udávaná hodnota výrobce. U výrobku *Lacidofil* se jeví jako nejvhodnější podmínky pro kultivaci aerobní prostředí téměř nezávisle od použité živné půdy. Výsledky u *Biopronu 9* jsou podobné jako u *Biopronu JUNIOR*, tedy že jako nejvhodnějším živnou půdou je *Tomato Juice* ale nelze říci, které prostředí anaerobní/aerobní je výhodnější.

Graf 27: *Probian mimi* – 10^{-3}



Probian mimi byl jediným produktem, který byl silně vyhraněný na živné médium. Bakterie z tohoto produktu rostly pouze na *Tomato Juice* agaru. Téměř žádný vliv na kultivaci a růst bakterií nemělo aerobní případně anaerobní prostředí, hodnoty byly skoro identické. I u toho produktu byl obsah bakterií zjištěný pomocí kultivace nižší než je obsah bakterií uváděný výrobcem.

V tabulce 13 můžeme nalézt hodnoty udávající celkový počet bakterií, které by člověk denně přijal pokud by dodržel doporučené dávkování výrobcem a pokud preparát obsahoval deklarované množství bakterií uvedené výrobcem. Dalším důležitým údajem v tabulce je celkový počet bakterií, který by člověk denně přijal pokud by dodržel dávkování doporučené výrobcem a pokud by jsme přepočítali obsah probiotických bakterií zjištěný námi provedenou kultivací. Na celkový výpočet byl vždy použit nejvyšší počet narostlých kolonií v daném měření u daného produktu. Tyto základní hodnoty jsme se pokusili porovnat v souvislosti s cenou. Cena výrobků se pohybovala od 78,- do 353,- Kč. Nejlépe z tohoto porovnání vyšel námi testovaný produkt *Biopron JUNIOR*. Dále to byl *Nutrolin-B*, který i přes svoji velmi nízkou cenu (78,- Kč), obsahoval více bakterií než uvádí výrobce. Jako střední třídu, z našich vybraných výrobků, můžeme označit výrobek *Lacidofil* a *Probian mimi*. U produktu *Biopron 9* se sice podařilo prokázat jisté množství probiotických bakterií, ale v porovnání s jeho cenou se jedná spíše o výrobek podprůměrný. Při výběru probiotického

preparátu je také nutné brát ohled na velikost balení a na dobu, po kterou nám jedno balení výrobku vydrží k užívání.

Tab. 13: Porovnání počtu narostlých kolonií s cenou

<i>Produkt</i>	<i>Hodnoty udané výrobcem</i>			<i>Hodnoty zjištěné kultivací</i>		<i>Rozdíl (pokus - výrobce)</i>	<i>Cena</i>
	<i>Počet MO/dávka</i>	<i>Počet dávek denně</i>	<i>Počet MO denně celkem</i>	<i>Nejvyšší počet dosažený kultivací</i>	<i>Celkový počet MO den</i>		
Biopron JUNIOR	$5 \cdot 10^9$	1	$5 \cdot 10^9$	$1,42 \cdot 10^{10}$	$1,42 \cdot 10^{10}$	$+ 9,2 \cdot 10^9$	183
Nutrolin-B	$4 \cdot 10^9$	2	$8,0 \cdot 10^9$	$1,21 \cdot 10^9$	$1,21 \cdot 10^{10}$	$+ 4,1 \cdot 10^9$	78
Lacidofil	$2,9 \cdot 10^9$	1	$2,9 \cdot 10^9$	$4,8 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$	$- 2,42 \cdot 10^9$	109
Probian mimi	$3 \cdot 10^9$	1	$3 \cdot 10^9$	$2,48 \cdot 10^8$	$2,48 \cdot 10^8$	$- 2,75 \cdot 10^9$	211
Biopron 9	$9 \cdot 10^9$	2	$1,8 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$- 1,78 \cdot 10^{10}$	353

Je možné konstatovat, že množství probiotických mikroorganismů ve vybraných preparátech deklarovaný výrobcem se neshodoval s námi zjištěnými počty bakterií, které byly nižší kromě výrobku Biopron JUNIOR a Nutrolin-B.

Důvodem může být jednak použitý postup kultivace, který je selektivní pro laktobacily, a také zjišťování pouze počtu životaschopných bakterií. S prodlužujícím se časovým intervalem od výroby je pravděpodobné, že se obsah životaschopných bakterií bude snižovat. Doba expirace použitých výrobků je uvedena v tabulce 14.

Tab. 14: Doby expirace použitých preparátů na kultivaci

Výrobek	Doba expirace
Biopron JUNIOR	březen 2010
Nutrolin-B	duben 2010
Lacidofil	březen 2010
Probian mimi	16.5. 2010
Biopron 9	březen 2010

Pro většinu námi vybraných produktů (Biopron JUNIOR, Probian mimi a Biopron 9) se jevil lepším živným médiem Tomato Juice agar, pouze u Lacidofilu a Nutrolinu-B proběhla lépe kultivace na M.R.S. agaru. Pokud bychom hodnotili vliv přístupu kyslíku při kultivaci, většina bakterií (Probian mimi, Biopronu 9 a Lacidofilu) preferovala aerobní kultivaci, výjimkou byl Biopron JUNIOR a Nutrolin-B. Což bylo v rozporu s naším očekáváním, předpokládali jsme vyšší počty probiotických bakterií u anaerobní kultivace, protože ta by měla lépe simulovat podmínky pro růst a množení těchto bakterií v zažívacím traktu lidí.

4 ZÁVĚR

Teoretická část

- V rámci této bakalářské práce byly v teoretické části shrnuty poznatky o probioticích, o jejich vlastnostech, mechanismu účinku a jejich vlivu na zdraví.
- Také byl popsán trávicí trakt lidí a bakterie trávicího traktu ve spojitosti s přirozenou mikroflórou a vlivu probiotik na její kvalitu.
- Nejdůležitější bakterie mléčného kvašení byly diskutovány podrobněji.
- Práce se věnuje i výživě dětí od nejútlejšího věku a jedna rozsáhlá kapitola se podrobně zabývá vztahem mezi typicky dětskými nemocemi (průjemy, zácpy, atopie, aj.) a použitím probiotik v pediatrické praxi.
- Na závěr teoretické části byl vypracován krátký přehled dostupných probiotických preparátů pro děti na českém trhu.

Praktická část

- V první praktické části byla vyhodnocena krátká sociologická studie, která byla prováděna ve spolupráci s firmou Valosun a.s. Tato studie se zaměřila na zjištění informovanosti žen v oblasti výživy a využití probiotik při prevenci a léčbě některých onemocnění u dětí.
- Z výsledků jasně vyplývá, že ženy nejsou příliš informovány a informace o probioticích a výživě obecně ani nevyhledávají. Probiotika by nejraději konzumovala ve formě potraviny a pro své děti by si představovaly produkt ve formě sypké směsi (Prášku) nebo ve formě kapek či sirupu. Také by jednoznačně preferovaly produkt s upravenou chutí, barvou i vůní. Tyto požadavky patrně vychází z předpokladu, že v takovéto formě a s úpravou senzorických vlastností bude výrobek lépe přijat dítětem, což je pro matku prioritní. Těmto všem požadavkům vyhovuje i námi testovaný produkt **Biopron JUNIOR**, který splňuje požadavky žen jak na formu výrobku a senzorickou úpravu, tak i na kvalitu. Biopron JUNIOR jako jeden z mála produktů při kultivaci vykázal vyšší obsah bakterií než jaký uváděl výrobce. Což může být způsobeno, větším množstvím bakterií ve výrobku než uvádí výrobce, nebo velmi šetrným výrobním postupem, při kterém nedochází k žádnému úhynu bakterií nebo kultivačním postupem zjišťování počtu bakterií (preference laktobacilů).
- V druhé praktické části byla zkoumána vitalita bakterií ve vybraných probiotických preparátech pro děti. Kultivace probíhala na dvou různých živných médiích (M.R.S agar × Tomato Juice Medium Base) a ve dvou různých prostředích (aerobní × anaerobní) při teplotě 37 °C. Ze šesti produktů pouze Nutrolin-B (sirup) a Biopron JUNIOR (sypká směs) obsahoval podle našeho měření více bakterií než uváděl výrobce, další produkty obsahovaly bakterií podstatně méně. U většiny produktů se jako vhodnější médium ukázal Tomato Juice Medium Base (Biopron JUNIOR, Probian mimi a Biopron 9), jako vhodnější typ kultivace převládalo aerobní prostředí (Lacidofil, Biopron 9, Probian mimi).
- Pro další testování by bylo vhodné se zaměřit na optimalizaci podmínek kultivace, identifikaci kultivovaných bakterií a také na zjištění počtu živých i mrtvých bakterií, což by mohlo vyjasnit rozdíly mezi deklarovaným množstvím a námi zjištěným množstvím bakterií v testovaných produktech.

5 LITERATURA

- [1] VASILJEVIC, T., SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. 2008, vol. 18, is. 7, s. 714-728.
- [2] HSIEH, Michael H. , VERSALOVIC, James. The Human Microbiome and Probiotics: Implications for pediatrics . *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2008, vol. 38, is. 10, s. 309-327.
- [3] FRIC, P. Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle . *CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE*. 2007, vol. 2, is. 3, s. 237-270.
- [4] TANNOK, Gerald W. The search for disease-associated compositional shifts in bowel bacterial communities of humans. *Trends in Microbiology*. 2008, vol. 16, is. 10, s. 488-495.
- [5] ADAMS, Martin R. Safety of industrial lactic acid bacteria . *Journal of Biotechnology*. 1999, vol. 68, is. 2-3, 19, s. 171-178.
- [6] ZBOŘIL, Vladimír, PROKOPOVÁ, Lucie, HERTLOVÁ, Miluše. MIKROFLÓRA TRÁVICÍHO TRAKTU: klinické souvislosti. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, a.s., 2005. 156 s. ISBN 80-247-0584-2.
- [7] GÖRNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, TYPOSET, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [8] KLIGLER, Benjamin , HANAWAY, Patrick , COHRSEN, Andreas. Probiotics in children. *Pediatric Clinics of North America*. 2007, vol. 54, is. 6, s. 949-967.
- [9] ISOLAURI, Erika , SALMINEN , Seppo , OUWEHAND, Arthur. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2004, vol. 18, no. 2, s. 299-313.
- [10] KAN, Shida, MASANOBU , Nanno. Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends in Immunology*. 2008, vol. 29, is. 11, s. 565-573.
- [11] FRÜHAUF, Pavel. Trendy ve výživě dětí po 6. měsíci života. *Pediatric pro praxi*. 2006, roč. 2006, č. 1, s. 40-42.
- [12] BERKOVÁ, Kamila. Obecné zásady výživy dětí a dorostu. *Pediatric pro praxi*. 2002, roč. 2002, č. 6, s. 301-302.
- [13] SÝKORA, Josef, SCHWARZ, Jan, SIALA, Konrád. Probiotika a dětský věk. *Pediatric pro praxi*. 2006, roč. 2006, č. 5, s. 264-270.
- [14] TLÁSKAL, Petr. Historie a současnost počáteční dětské výživy. *Pediatric pro praxi*. 2008, roč. 2008, č. 9(2), s. 86-92.

- [15] NEVORAL, Jiří. Prebiotika, probiotika a symbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2005, roč. 2005, č. 2, s. 59-65.
- [16] AMBROŽOVÁ, Helena, SCHRAMLOVÁ, Jana. Virové gastroenteritidy. *Pediatric pro praxi*. 2007, roč. 2007, č. 1, s. 43-47.
- [17] AMBROŽOVÁ, Helena. Infekční průjmy u dětí a jejich léčba. *Pediatric pro praxi*. 2006, roč. 2006, č. 3, s. 154-156.
- [18] AMBROŽOVÁ, Helena. Infekční průjmová onemocnění u dětí. *Pediatric pro praxi*. 2004, roč. 2004, č. 5, s. 238-240.
- [19] NEVORAL, Jiří. Současná terapie idiopatických střevních zánětů u dětí. *Pediatric pro praxi*. 2007, roč. 2007, č. 8(6), s. 369-373.
- [20] LATA, Jan, JURÁNKOVÁ, Jana, PŘÍBRAMSKÁ, Veronika, OSTŘÍZEK, Tomáš. Probiotika v gastroenterologii a hepatologii. *Interní medicína pro praxi*. 2007, roč. 2007, č. 1, s. 7-10.
- [21] FRÍČ, Přemysl. Probiotika v terapii chorob trávicího ústrojí. *Interní medicína pro praxi*. 2005, roč. 2005, č. 10, s. 434-437.
- [22] NEUMANN, David, POLZER, Oldřich. Zácpa u dětí. *Pediatric pro praxi*. 2004, roč. 2004, č. 1, s. 31-34.
- [23] SÝKORA, Josef. *Helicobacter pylori* a gastrointestinální projevy u dětí. *Pediatric pro praxi*. 2006, roč. 2006, č. 2, s. 74-79.
- [24] FRÍČ, Přemysl. Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatric pro praxi*. 2008, roč. 2008, č. 9(1), s. 46-50.
- [25] ŠULÁKOVÁ, Astrida. Dieta u dětí s atopickým ekzémem. *Pediatric pro praxi*. 2005, roč. 2005, č.5, s. 230-234.
- [26] NOVÁK, Jiří. Primární prevence alergie a alergického astmatu. *Pediatric pro praxi*. 2007, roč. 2007, č.3, s. 144-146.
- [27] STIBŮREK, Oldřich, PŘÍBRAMSKÁ, Veronika, LATA, Jan. Místo probiotik v léčbě (nejen) gastrointestinálních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 2008, roč. 2009, č. 11(1), s. 25-29.
- [28] RYŠAVÁ, Lydie. Doplnky stravy ... ale jak, kdy a kde?. *Interní medicína pro praxi*. 2008, roč. 2008, č.10(11), s. 508-510.

- [29] ZECHMEISTEROVÁ, Lucie. Faktory ovlivňující kvalitu červeného vína. [s.l.], 2008. 75 s. VUT, chemická fakulta ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, Csc.

Seznam použitých obrázků mikroorganismů a obrázků v příloze 2: Průzkum trhu

- [30] Obr. 2: *Corbis* [online]. 2001-2009 [cit. 2009-04-29]. Text v angličtině. Dostupný z WWW: <<http://pro.corbis.com/search/Enlargement.aspx?CID=isg&mediauid=%7B852CE142-D161-4BBF-BA3B-808181005787%7D>>.
- [31] Obr. 3: *Corbis* [online]. 2001-2009 [cit. 2009-04-29]. Text v angličtině. Dostupný z WWW: <<http://pro.corbis.com/search/Enlargement.aspx?CID=isg&mediauid=%7BEEF3D3AD-2887-4B1C-80EB-557523076F48%7D>>.
- [32] Obr. 4: PATÁKOVÁ, Petra. *Galerie mikroorganismů VŠCHT* [online]. 2003- , 13.2. 2003 [cit. 2009-04-29]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/galerie/>>.
- [33] Obr. 5: PATÁKOVÁ, Petra. *Galerie mikroorganismů VŠCHT* [online]. 2003- , 13.2. 2003 [cit. 2009-04-29]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/galerie/>>.
- [34] Obr. 6: *News and Events* [online]. 2006- , 05/23/2006 [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/mar05/D035-1.htm>>.
- [35] Obr. 7: *Universidad of Granada* [online]. 2001- [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://prensa.ugr.es/prensa/campus/prensa.php?nota=3395>>.
- [36] Obr. 8: PATÁKOVÁ, Petra. *Galerie mikroorganismů VŠCHT* [online]. 2003- , 13.2. 2003 [cit. 2009-04-29]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/galerie/>>.
- [37] Obr. 9: *Health to know* [online]. 2006-2009 , 26.9.2006 [cit. 2009-04-29]. Text v angličtině. Dostupný z WWW: <<http://www.health2know.com/2006-09/>>.
- [38] Obr. 10: *JGI* [online]. 1997-2009 , 3.7.2002 [cit. 2009-04-29]. Text v angličtině. Dostupný z WWW: <<http://genomeportal.jgi-psf.org/biflo/biflo.home.html>>.
- [39] Obr. 14: *Online-lékárna* [online]. 2009 , 25.4.2009 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.online-lekarna.cz/index.php?cmd=product&catid=22&id=4207>>.
- [40] Obr. 15: *DocSimon : internetová lékárna* [online]. 2007 , 3.1.2009 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.docsimon.cz/zbozi/nutrolin-b-sirup-60ml>>.

- [41] Obr. 16: *Goldim s.r.o. infoweb* [online]. 2008 , 20.8.2008 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.goldim.cz/index.php?page=shop.EshopProductDetail&lang=cs&id=43&stheme=Eshop&parent=59&PHPSESSID=dgwtvpmf&PHPSESSID=dgwtvpmf>>.
- [42] Obr. 17: *Biosféra : specialista na zdravý životní styl* [online]. 2004-2009 , 11.10.2008 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.biosfera.cz/asp-vlaknina-pro-deti-100g/produkt/cz/>>.
- [43] Obr. 18: *Valosun* [online]. 2005-2008 , 10.8.2008 [cit. 2008-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.valosun.cz/sk/produkty/biopron-junior.html>>.
- [44] Obr. 19: *DocSimon : internetová lékárna* [online]. 2007 , 3.1.2009 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.docsimon.cz/zbozi/probian-mimi-15-sacku>>.
- [45] Obr. 20: *Probiotika pro děti* [online]. 2005-2007 , 3.2.2008 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.probiotikaprodeti.cz/cs/probiotika-protexin-restore.php>>.
- [46] Obr. 21: *PICNIC* [online]. 2006 , 14.13.2009 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.picnicsro.cz/kompletni-sortiment/laboratoires-vitarmony/prirozena-obranyschopnost-mes-defenses-10sacku.html>>.
- [47] Obr. 22: *DocSimon : internetová lékárna* [online]. 2007 , 3.1.2009 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.docsimon.cz/zbozi/probian-deti-tbl-60>>.
- [48] Obr. 23: *PharmaSuisse Laboratories* [online]. 2008 , 4.12.2008 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <http://skatekm.cz/_work/suisse/lactocare1.html>.
- [49] Obr. 24: *Lékarna.cz* [online]. 1998-2009 , 29.4.2009 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.lekarna.cz/delpharmea-terrapin-probio-pro-deti-tbl-90/>>.
- [50] Obr. 25: *Valosun* [online]. 2005-2008 , 10.8.2008 [cit. 2008-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.valosun.cz/produkty/biopron-9-60.html>>.
- [51] Obr. 26: KROUPA, Zdeněk. *LEKARNÁ NA POLIKLINICE II.* [online]. 2007-2009 , 16.9.2008 [cit. 2009-05-05]. Text v češtině. Dostupný z WWW: <<http://www.lekarna2.cz/eshop/Zazivaci-potize/Prujem/Lacidofil-cps-45>>.
- [52] Obr. 27: *I-liek.sk* [online]. 2009 , 21.4.2009 [cit. 2009-05-05]. Text ve slovenštině. Dostupný z WWW: <http://i-liek.sk/index.php?main_page=product_info&cPath=11_107&products_id=1070>.

6 SEZNAM ZKRATEK

ABKM	Alergie na bílkoviny kravského mléka
ADE	Atopická dermatitida/ekzém
ATB	Antibiotika, antibiotická léčba
CFU	ang. Colony forming unit – kolonii tvořící jednotku
CN	Crohnova nemoc
GALT	ang. Gut associated lymphoid tissue – lymfoidní tkáň střeva
GIT	Gastrointestinální trakt
IBD	Zánětlivé onemocnění střev, tj. gastrointestinální onemocnění
IEL	Intraepitelové lymfocyty
ISZ	Idiopatické střevní onemocnění
KV	Komplementární výživa
LAB	Bakterie mléčného kvašení
MO	Mikroorganismus
NE	Nekrotizující enterokolitida
UK	Ulcerózní kolitida
VLS#3	Směs obsahující tři druhy bakterií: <i>Lactobacillus sp.</i> , tři druhy <i>Bifidobacterium sp.</i> a <i>Streptococcus thermophilus</i>

7 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Dotazník

Příloha 2: Průzkum trhu

Příloha 3: Legislativa

Příloha 4: Tabulka 10 a Tabulka 11

Příloha 5: Mikroskopické preparáty

PŘÍLOHY

Příloha 1

Dotazník

Vážení respondenti,

dotazník, který se Vám právě dostal do rukou, bude součástí bakalářské práce, jenž je zpracovávána na Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně studentkou Kamilou Augustovou.

Záměrem této práce je zmapovat situaci v naší společnosti v souvislosti s užíváním probiotických preparátů určených pro děti. Děkuji Vám za vaši ochotu a trpělivost při vyplňování dotazníku. Dotazník je anonymní.

Mgr. Dana Vránová Ph.D.

*vedoucí bakalářské práce
Ústav chemie potravin a biotechnologií
Fakulta chemická VUT v Brně
Purkyňova 118
612 00 Brno*

1. Setkali jste se již s pojmem probiotika?

- ☐ ne, tento pojem slyším poprvé
- ☐ ano, už jsem ho slyšel(a) ale moc bližších informací nevím
- ☐ ano, s tímto pojmem jsem se již setkal(a) a vím, co znamená

2. Znáte nějaké potraviny, které obsahují probiotika?

- ☐ ne, neznám
- ☐ ano, prosím napište jaké

3. Konzumujete potraviny, které probiotika obsahují?

- ☐ ne, neznám takové potraviny
- ☐ ano, konzumuji (prosím, napište které)

4. Pokud tyto potraviny konzumujete, jak často je zařazujete do vašeho jídelníčku?

- ☐ tyto potraviny nekonzumuji
- ☐ každý den
- ☐ 1 – 3krát týdně
- ☐ několikrát do měsíce
- ☐ jednou do měsíce
- ☐ jiná možnost, prosím napište

5. Kde byste tyto potraviny, které obsahují probiotika, hledali?

- ☐ ve specializovaných obchodech
- ☐ v obyčejných obchodech mezi ostatními potravinami
- ☐ v supermarketech ve zvláštním oddělení
- ☐ jiná možnost, prosím napište

6. Jak často by podle Vás bylo vhodné užívat probiotika či probiotické preparáty, aby měly vámi požadovaný účinek?

- ☐ každý den
- ☐ 1 – 3krát týdně
- ☐ několikrát do měsíce
- ☐ jednou do měsíce
- ☐ jiná možnost, prosím napište

7. Užíváte nějaký probiotický preparát (koupený v lékárně)?

- ☐ ne, ani jsem neužíval(a)
- ☐ ne, ale dříve jsem užíval(a)
- ☐ ne, ale přemýšlím o tom
- ☐ ano, užívám

8. V jaké formě byste nejraději konzumovali probiotika?

- ☐ ve formě běžné potravy (kysané nápoje, jogurty, sýry apod.)
- ☐ ve formě potravinových doplňků (tablety, kapky, prášek)
- ☐ jiná možnost, prosím napište

9. Pokud užíváte probiotika, tak za jakým účelem?

- ☐ neužívám žádný probiotický preparát
- ☐ jako prevenci před nějakým onemocněním
- ☐ na zlepšení zažívání
- ☐ na zlepšení imunitního systému
- ☐ na zlepšení alergie
- ☐ po užívání antibiotik
- ☐ na doporučení lékaře
- ☐ jiná možnost, prosím napište

10. Pokud jste už probiotika užívali, jakou máte s nimi zkušenost?

- ☐ velice kladnou, pomohli mi od potíží
- ☐ spíše kladnou
- ☐ nepomohli mi
- ☐ s užíváním probiotik nemám zkušenost

11. Myslíte si, že je dobré probiotika užívat i v těhotenství?

- ☐ nevím
- ☐ ano, mohou být prospěšné
- ☐ ne, myslím, že nemají žádný účinek

12. Setkali jste se už s probiotiky pro děti a pokud ano kde?

- ☐ nesetkal(a)
- ☐ v lékárně
- ☐ u lékaře
- ☐ u přátel
- ☐ jiná možnost, prosím napište

13. V jakém věku dítěte by podle Vás bylo vhodné začít s užíváním probiotik?

- ☐ hned od narození
- ☐ od 3 měsíců
- ☐ po ukončení kojení
- ☐ ve 3 letech
- ☐ v 6-ti letech
- ☐ později
- ☐ myslím, že tyto preparáty nejsou vhodné pro děti
- ☐ jiná možnost, prosím napište

14. Jakou formu probiotik byste u preparátu, který by byl určen dítěti, preferovali?

- ☐ prášek na rozpouštění
- ☐ tabletu
- ☐ kapky
- ☐ jiná možnost, prosím napište

15. Myslíte si, že by bylo dobré, aby tyto preparáty pro děti byly nějak dochuceny?

- ☐ ano, měla by být upravena chuť, vůně i vzhled (např. barva)
- ☐ ano, měla by být upravena chuť
- ☐ ano, měla by být upravena vůně
- ☐ ano, měl by být upraven vzhled
- ☐ ne, není potřeba

16. Při jakých zdravotních obtížích byste tyto preparáty dětem podávali?

- ☐ při zažívacích obtížích (průjemy, zácpy, atd.)
- ☐ po užívání antibiotik
- ☐ na zvýšení jejich imunity
- ☐ při alergických onemocnění
- ☐ preventivně, za účelem předcházení výše uvedených onemocnění
- ☐ jiná možnost, prosím napište

17. Kde hledáte informace týkající se zdraví a výživy?

- ☐ na internetu
- ☐ v knihách
- ☐ v časopisech
- ☐ u lékaře
- ☐ v lékárně
- ☐ informuji se u známých
- ☐ jiná možnost, prosím napište

18. Zdá se Vám, že informací o probiotických preparátech pro děti je dostatek ?

- ☐ ano, veškeré informace jsou lehce dostupné
- ☐ ne, chtěl(a) bych, aby bylo těchto informací více a byly lépe dostupné
- ☐ nevím, informace o těchto preparátech jsem zatím nezjišťoval(a)
- ☐ jiná možnost, prosím napište

19. Jakým způsobem postupujete při výběru probiotik?

- ☐ podle ceny
- ☐ podle účinné látky
- ☐ doporučení lékaře
- ☐ doporučení lékárníka
- ☐ podle reklamy
- ☐ podle výrobce
- ☐ doporučení známého/ známé
- ☐ jiná možnost, prosím napište

20. Myslíte si, že na trhu je dostatečný výběr probiotik určených pro děti?

- ☐ ano, výběr je dostatečně široký
- ☐ ne, výběr by mohl být širší
- ☐ nevím, nezjišťoval(a) jsem
- ☐ jiná možnost, prosím napište

21. Váš věk

- ☐ do 20-ti let
- ☐ 21 – 24
- ☐ 25 – 29
- ☐ 30 – 34
- ☐ 35 – 39

☐ 40 – 45

22. Vzdělání

- ☐ základní
- ☐ středoškolské
- ☐ vysokoškolské

Děkuji Vám za ochotu a přeji pěkný den.

Příloha 2

Průzkum trhu

Probiotické kapky pro děti 5 ml

- forma: kapky
- obsah/1 dávka: 5 kapek/ $100 \cdot 10^6$
- složení probiotický bakterií: *L. reteri* Protectic
- výrobce: BIO GAIA
- orientační cena: 622,- Kč
- věk užívání: těhotné, kojící ženy, kojenci

od 1 měsíce

- dávkování: 5 kapek 1x denně



Obr. 14: Probiotické kapky pro děti 5 ml [39]

NUTROLIN-B sirup 60ml

- forma: sirup
- obsah/1 dávka: 5 ml naředěného sirupu obsahuje: *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus sp.*) 4 miliardy
- složení probiotický bakterií: *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus sp.*), Vitamín B1 2mg, Vitamín B2 2,5mg, Vitamín PP 20mg, Vitamín B6 1,5mg
- výrobce: Cipla Ltd., Mumbai, Indie
- orientační cena: 78,- Kč
- věk užívání: od 1 roku
- dávkování: 2x denně 5ml



Obr. 15: NUTROLIN-B sirup 60 ml [40]

BABIO biomléko 1 s probiotiky 300 g

- forma: sypká směs – sušené mléko
- obsah/1 dávka: není uvedeno
- složení probiotický bakterií: kultury bifidobakterií BiFiComplex
- výrobce: Gildám
- orientační cena: 199,- Kč
- věk užívání: od narození



Obr. 16: BABIO biomléko 1 s probiotiky 300 g [41]

Asp Vlákna pro děti 100g

- forma: sypká směs
- obsah/1 dávka: není uvedeno
- složení probiotický bakterií: *Bifidobacterium (bifidum, breve)*, *Lactobacillus (delbrueckii, sups. bulgaricus, rhamnosus, acidophilus, casei)*, *Streptococcus thermophilus*, prebiotika – vláknina, inulín
- výrobce: ASP, ČR
- orientační cena: 90,- Kč
- věk užívání: od ukončeného 6 měsíce
- dávkování: děti od ½ do 1 roku - půl odměrky (2,5 g) rozpustit ve 100 ml tekutiny, od jednoho roku - jedna odměrka (5 g) rozpustit ve 100 ml a pak zapít dalšími 100 ml



Obr. 17: Asp Vlákna pro děti 100 g [42]

Biopron JUNIOR

- forma: sáčky
- obsah/1 dávka: $5 \cdot 10^9$ / 1 šáček
- složení probiotický bakterií: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium (bifidum, infantis)*
- výrobce: VALOSUN a.s.
- orientační cena: 183,- Kč
- věk užívání: od ukončeného 4 měsíce
- dávkování: 1 denně během jídla



Obr. 18: Biopron JUNIOR [43]

PROBIAN mimi 15 sáčků

- forma: sáčky
- obsah/1 dávka: Probiotic komplex 3 miliardy (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*), Prebiotic komplex 150mg (Fruktooligosacharidy-inulin 150mg) v 1 sáčku
- výrobce: Garden State Nutritionals Inc., USA
- orientační cena: 211,- Kč
- věk užívání: od ukončeného 4 měsíce



Obr. 19: PROBIAN mimi [44]

- dávkování: 1x denně, obsah sáčku rozmíchat ve sklenici vody, mléka, čaje nebo vmíchat přímo do jídla

Protexin RESTORE – Probiotika pro děti Restore 15 sáčků

- forma: sáčky
- obsah/1 dávka: 1 sáček/ $5 \cdot 10^9$
- složení probiotický bakterií: *Bifidobacterium (bifidum, breve)*, *Lactobacillus (bulgaricus, rhamnosus, acidophilus)*, *Streptococcus thermophilus*
- výrobce: LEPICOL LTD. BIRMINGHAM
- orientační cena: 215,- Kč
- věk užívání: od ukončeného 1 roku
- dávkování: 1 sáček denně se přidává do jídla, vody, mléka či jiné šťávy



Obr. 20: Protexin RESTORE [45]

Přirozená obranyschopnost (Mes Defense) 10 sáčků

- forma: sáček
- obsah/1 dávka: 50 mg *Bifidobacterium Bb 12*
- složení probiotický bakterií: *Bifidobacterium Bb 12* + 2,76 g frukto-oligosacharidy
- výrobce: Laboratoires Vitarmonyl 85612 Montaigu, France
- orientační cena: 191,- Kč
- věk užívání: od 3 do 12 let
- dávkování: 1 sáček ráno nebo v poledne, rozpuštěný v troše vody nebo vmíchaný do jogurtu nebo kompotu



Obr. 21: Přirozená obranyschopnost 10 sáčků [46]

PROBIAN děti tbl. 60

- forma: žvýkácí tablety
- obsah/1 dávka: Probiotic komplex $5 \cdot 10^9$ + Prebiotic komplex 250 mg/ 1 tableta
- složení probiotický bakterií: *Bifidobacterium (infantis, longum)*, *Lactobacillus (rhamnosus, acidophilus)*
- výrobce: Garden State Nutritionals Inc., USA
- orientační cena: 355,- Kč
- věk užívání: od 3 let
- dávkování: 1 tableta 1-2x denně při jídle, mají jahodovou příchut'



Obr. 22: PROBIAN děti tbl. 60 [47]

Lactocare

- forma: žvýkácí tablety
- obsah/1 dávka: $7 \cdot 10^9$ KTJ
- složení probiotický bakterií: *Lactobacillus sporogenes*
- výrobce: PharmaSuisse Laboratoriem S.v.l, Itálie
- orientační cena: 172,- Kč
- věk užívání: od 3 let
- dávkování: 1 žvýkácí tableta denně, nejlépe na lačný žaludek



Obr. 23: Lactore [48]

Delpharmea Terrapin Probio pro děti tbl. 90

- forma: tablety
- obsah/1 dávka: -
- složení probiotický bakterií: *Lactobacillus (rhamnosus, acidophilus)*, *Bifidobacterium (longum, infantis)*
- výrobce: GARDEN STATE NUTRITIONALS
- orientační cena: 315,- Kč
- věk užívání: od 3 let
- dávkování: 1 – 2 tablety denně



Obr. 24: Terapin Probio pro děti tbl. 90 [49]

Biopron 9 tob. 60

- forma: tobolky
- obsah/1 dávka: 1 tobolka/ $9 \cdot 10^9$
- složení probiotický bakterií: *Bifidobacterium (bifidum, breve, longum)*, *Lactobacillus (rhamnosus, acidophilus, lactis)*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus*
- výrobce: Valosun a.s.
- orientační cena: 353,- Kč
- věk užívání: od ukončeného 4 roku
- dávkování: 1 tableta 1x – 2x denně



Obr. 25: Biopron 9 tob. 60 [50]

LACIDOFIL CPS 45

- forma: želatinové tobolky
- obsah/1 dávka: 1 tobolka/ $0,145 \cdot 10^9$ *L. acidophilus*, $2,755 \cdot 10^9$ *L. rhamnosus*
- složení probiotický bakterií: *Lactobacillus (rhamnosus, acidophilus)*, maltodextrin, magnésium-stearát, kyselina askorbová, želatina
- výrobce: ROUGIER, S.R.O., PRAHA
- orientační cena: 109,- Kč
- věk užívání: od ukončeného 1 měsíce
- dávkování: Pro předcházení trávicím poruchám se užívá 1 tobolka denně. Pro léčení trávicích poruch u dětí od 2 let, u mladistvých a dospělých se obvykle užívá 3krát denně po jedné až dvou tobolkách. Kojencům se podává 1 tobolka denně. U dětí do 6 let věku je třeba konzultovat podávání přípravku Lacidofil s lékařem.



Obr. 26: LACIDOFIL CPS 45 [51]

Hylak forte kapky 100 ml

- forma: kapky
- obsah/1 dávka: 100 ml / *Escherichiae coli metabolita* 24,9481 g, *Streptococci faecalis metabolita* 12,4741 g, *Lactobacilli acidophili metabolita* 12,4741 g, *Lactobacilli helveticus metabolita* 49,8960 g.
- složení probiotický bakterií: *Escherichiae coli metabolita*, *Streptococci faecalis metabolita*, *Lactobacilli acidophili metabolita*, *Lactobacilli helveticus metabolita*.
- výrobce: Ratiopharm
- orientační cena: 147,- Kč
- věk užívání: již od kojeneckého věku
- dávkování: Dospělí : V prvních dnech 3krát denně 2 ml. Kojenci a děti: V prvních dnech 3krát denně 1 ml, po zlepšení obtíží je možno dávku redukovat až na polovinu.



Obr. 27: Hylak forte kapky 100 ml [52]

Příloha 3

Legislativa

Kvalita mléčných a probiotických výrobků je stanovena vyhláškou Mze. č. 77/2003 Sb. v platném znění. Součástí zákona je i příloha. Novela vyhlášky (370/2008) nabyla účinnosti dne 7.10.2008. Vyhláška je rozdělena do tří oddílů:

- Oddíl 1 - Mléko a mléčné výrobky
- Oddíl 2 - Mražené krémy
- Oddíl 3 - Jedlé tuky a oleje

Tab. 7: Přehled právních opatření a předpisů zahrnující tato vyhláška

Oddíl 1	<i>Mléčné výrobky</i>
	§ 1 Definice jednotlivých produktů a pojmů § 2 Členění na druhy, skupiny a podskupiny § 3 Označování obalů § 4 Požadavky na jakost § 5 Uvádění do oběhu
Oddíl 2	<i>Mražené krémy</i>
	§ 6 Definice jednotlivých produktů § 7 Členění na skupiny a podskupiny § 8 Označování obalů § 9 Požadavky na jakost § 10 Uvádění do oběhu
Oddíl 3	<i>Jedlé tuky a oleje</i>
	§ 11 Definice jednotlivých produktů § 12 Členění na druhy, skupiny a podskupiny § 13 § 14 zrušen vyhláškou č. 124/2004 Sb. § 15 Uvádění do oběhu § 15a Velkoobjemová přeprava tuků a olejů po moři § 16 Zrušovací ustanovení § 17 Přechodná ustanovení § 18 Účinnost

Podle této vyhlášky se mikroorganismy mohou využít při výrobě kysaného mléčného výrobku, který je definován jako výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi za použití mikroorganismů (viz. Tab. 8: Druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích), tepelně neošetřený po kysacím procesu. Dále se mohou mikroorganismy nacházet v jogurtu, který lze popsat jako výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi za použití mikroorganismů (viz. Tab. 8: Druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích). Na obalu takového výrobku musí být vždy uveden název druhu nebo skupiny, obsah tuku, použitá ochucující složka, označení výrobku jako slazený, pokud je přidáno sladidlo nebo přírodní sladidlo, datum použitelnosti, popřípadě použitou ochucující složku podle zvláštního předpisu apod. Označením „mléčný“

nebo „jogurtový“ lze označit pouze výrobek, v němž mléko (nebo mléčný výrobek) nebo jogurt tvoří nejméně 50 % hmotnosti tohoto výrobku. Na požadavky na jakost jednotlivých skupin mléčných výrobků a druhů mikroorganismů mléčného kysání pro výrobu kysaných mléčných výrobků jsou kladeny vysoké nároky, musí splňovat fyzikální, chemické a mikrobiologické požadavky uvedené v předpisech Evropských společenství (nařízení Rady (ES) č. 2597/94, nařízení Rady (ES) č. 5991/94, nařízení Komise (ES) č. 577/97) a v Tab. 6 Fyzikální, chemické a mikrobiologické požadavky na jednotlivé mléčné výrobky a na druhy mikroorganismů mléčného kysání. Všechny tyto mléčné výrobky se většinou skladují, přepravují a uvádějí do oběhu při teplotě od 4 °C do 8 °C.

Tab. 8: Druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích

Druh výrobku	Použité mikroorganismy	Mléčné mikroflóry výrobku v 1g
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	10^6 <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Jogurty	protosymbiotická směs <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	10^7
Kysané mléko, vč. smetanového zákysu, podmáslí a kysané smetany	monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	10^6
Kefír	zákys připravený z kefírových zrn, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašujících laktózu <i>Kluyveromyces marxianus</i> i <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> a dále <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> a <i>Aerobacter</i> , rostoucí ve vzájemném společenství	bakterie mléčného kvašení 10^6 a kvasinky 10^4
Kefírové mléko	zákys skládající se z kvasinkových kultur rodu <i>Kluyveromyces</i> , <i>Torulopsis</i> nebo <i>Candida valila</i> a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze	bakterie mléčného kvašení 10^6 a kvasinky 10^2
Kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	<i>Bifidobacterium</i> sp. v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení	10^6 bifidobakterie

U jogurtových výrobků mohou být kromě základní jogurtové kultury přidávány kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhají dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku výrobku. Musí však být zachován optimální poměr obou základních kmenů jogurtové kultury.

Tab. 9: Fyzikální, chemické a mikrobiologické požadavky na jednotlivé mléčné výrobky a na druhy mikroorganismů mléčného kysání

Smetana tekutá		
Druh výrobku	Obsah tuku (v % hmot.)	
Smetana	více než 10,0 včetně	
Smetana ke šlehání	více než 30,0 včetně	
Smetana vysokotučná	více než 35,0 včetně	
Kysané mléčné výrobky		
Druh výrobku	Obsah tuku (v % hmot.)	Obsah sušiny tukuprosté (v % hmot. nejméně)
Kysaná smetana	více než 10,0 včetně	8,0
Kysané mléko vč. jogurtového	více než 0,5	
Kysané mléko odtučněné	méně než 0,5 včetně	
Podmáslí	méně než 1,5 včetně	7,0
Jogurt bílý smetanový	více než 10,0 včetně	-
Jogurt bílý	více než 3,0 včetně	8,2
Jogurt bílý se sníženým obsahem tuku	méně než 3,0	
Jogurt bílý nízkotučný nebo odtučněný	méně než 0,5 včetně	

Příloha 4

Tabulky

Tab. 10: Počty probiotických bakterií po kultivaci preparátů Biopron JUNIOR, Probian mimi, Biopron 9

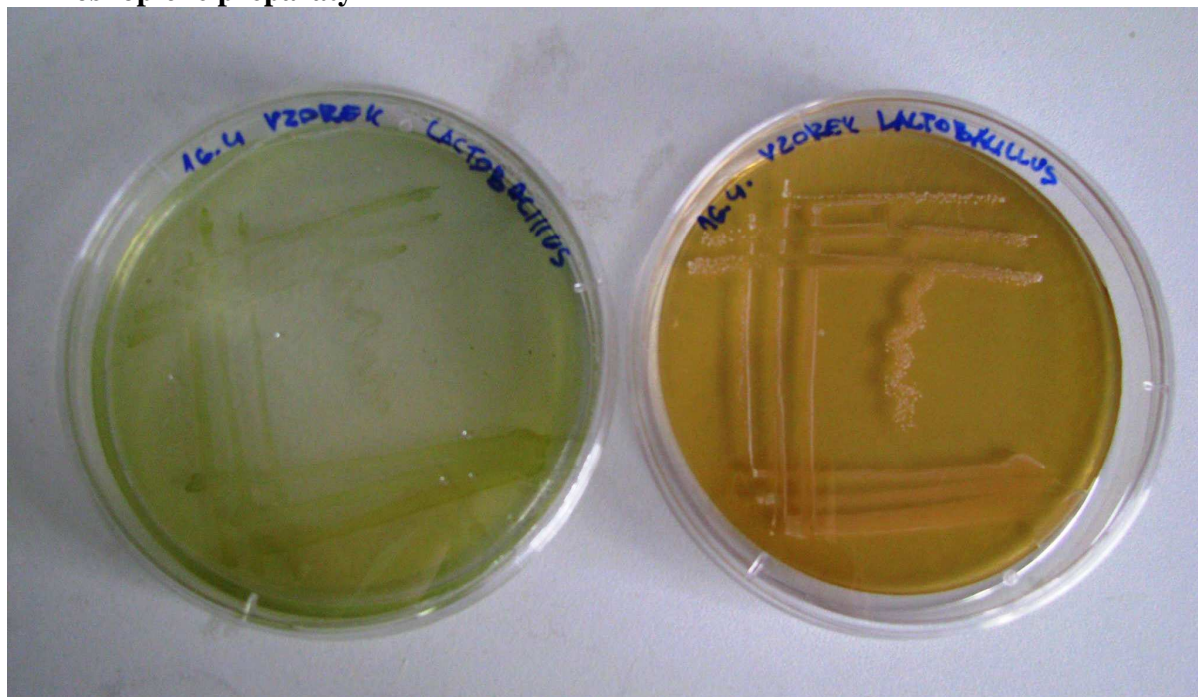
Ředění	Kultivace	Živná půda	Biopron JUNIOR		Probian mimi		Biopron 9	
			Počet MO	KTJ	Počet MO	KTJ	Počet MO	KTJ
10^{-1}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-	-	-
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-	-	-
10^{-2}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-	-	-
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	99	$2,48 \cdot 10^8$	104	$1,04 \cdot 10^8$
		M.R.S. agar	-	-	0	0	69	$6,90 \cdot 10^7$
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	84	$2,10 \cdot 10^8$	120	$1,20 \cdot 10^8$
		M.R.S. agar	-	-	0	0	32	$3,20 \cdot 10^7$
10^{-4}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	10	$2,50 \cdot 10^8$	12	$1,20 \cdot 10^8$
		M.R.S. agar	-	-	0	0	2	$2,00 \cdot 10^7$
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	17	$4,25 \cdot 10^8$	5	$5,00 \cdot 10^7$
		M.R.S. agar	-	-	0	0	7	$7,00 \cdot 10^7$
10^{-5}	Aerobní	Tomato Juice	121	$1,21 \cdot 10^{10}$	0	0	1	$1,00 \cdot 10^7$
		M.R.S. agar	7	$7,00 \cdot 10^8$	0	0	0	0
	Anaerobní	Tomato Juice	142	$1,42 \cdot 10^{10}$	2	$5,00 \cdot 10^8$	2	$2,00 \cdot 10^7$
		M.R.S. agar	35	$3,50 \cdot 10^9$	0	0	0	0
10^{-6}	Aerobní	Tomato Juice	7	$7,00 \cdot 10^8$	-	-	-	-
		M.R.S. agar	9	$9,00 \cdot 10^8$	-	-	-	-
	Anaerobní	Tomato Juice	10	$1,00 \cdot 10^9$	-	-	-	-
		M.R.S. agar	0	0	-	-	-	-

Tab. 11: Počty probiotických bakterií po kultivaci preparátů Lacidofil a Nutrolin-B

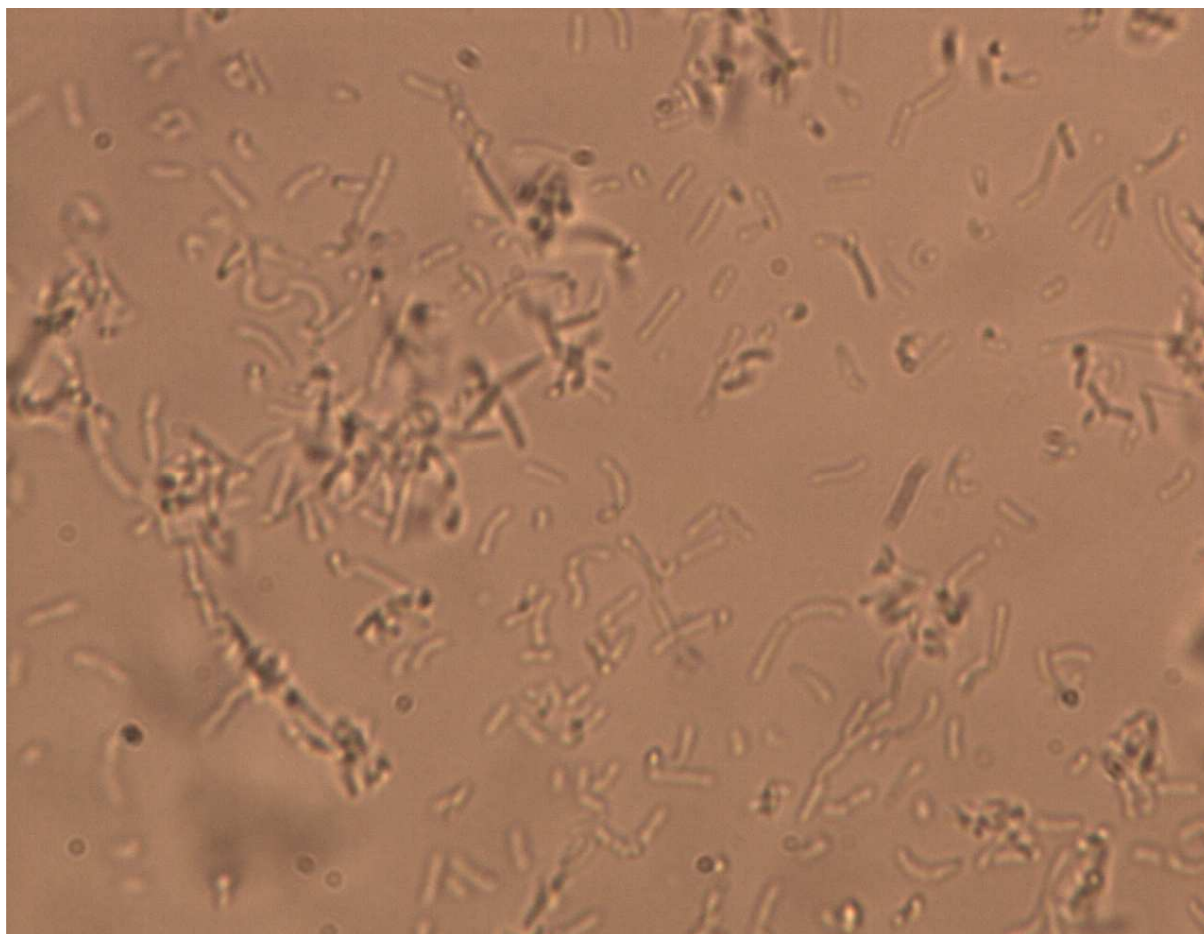
Ředění	Kultivace	Živná půda	Lacidofil		Nutrolin-B	
			Počet MO	KTJ	Počet MO	KTJ
10^{-1}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-
10^{-2}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-
10^{-3}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	-	-
		M.R.S. agar	-	-	-	-
10^{-4}	Aerobní	Tomato Juice	-	-	89	$8,90 \cdot 10^8$
		M.R.S. agar	-	-	95	$9,50 \cdot 10^8$
	Anaerobní	Tomato Juice	-	-	121	$1,21 \cdot 10^9$
		M.R.S. agar	-	-	143	$1,4 \cdot 10^8$
10^{-5}	Aerobní	Tomato Juice	44	$4,40 \cdot 10^8$	14	$1,4 \cdot 10^8$
		M.R.S. agar	48	$4,80 \cdot 10^8$	14	$1,4 \cdot 10^8$
	Anaerobní	Tomato Juice	36	$3,60 \cdot 10^8$	14	$1,4 \cdot 10^8$
		M.R.S. agar	35	$3,50 \cdot 10^8$	10	$1 \cdot 10^8$
10^{-6}	Aerobní	Tomato Juice	4	$4,00 \cdot 10^7$	0	0
		M.R.S. agar	2	$2,00 \cdot 10^7$	2	$2 \cdot 10^7$
	Anaerobní	Tomato Juice	4	$4,00 \cdot 10^7$	2	$2 \cdot 10^7$
		M.R.S. agar	4	$4,00 \cdot 10^7$	5	$5 \cdot 10^7$

Pozn.: Pole v tabulce označené pomlčkou znamenají nulový počet narostlých kolonií nebo naopak nepočitatelné množství kolonií.

Příloha 5
Mikroskopické preparáty



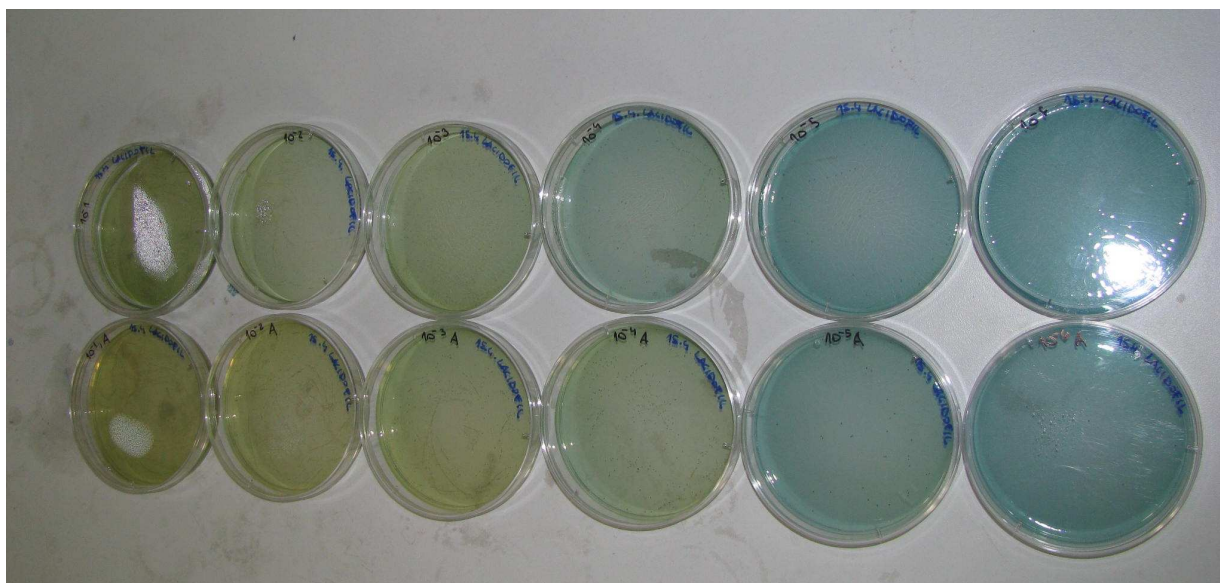
Obr.28: Kontrolní vzorek Lactobacillus 211/06: vlevo M.R.S agar, vpravo Tomato Juice agar



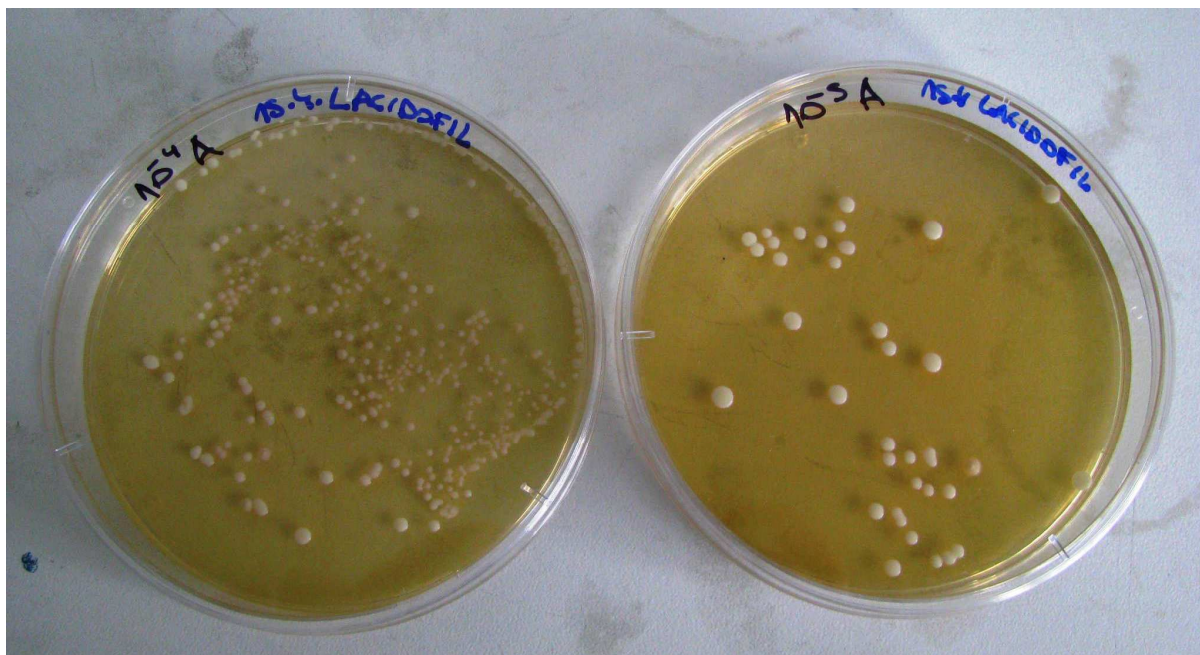
Obr.29: Kontrolní vzorek Lactobacillus 211/06: aerob. kultivace, Tomato Juice médium, zvětšení 1000x imerzní objektiv



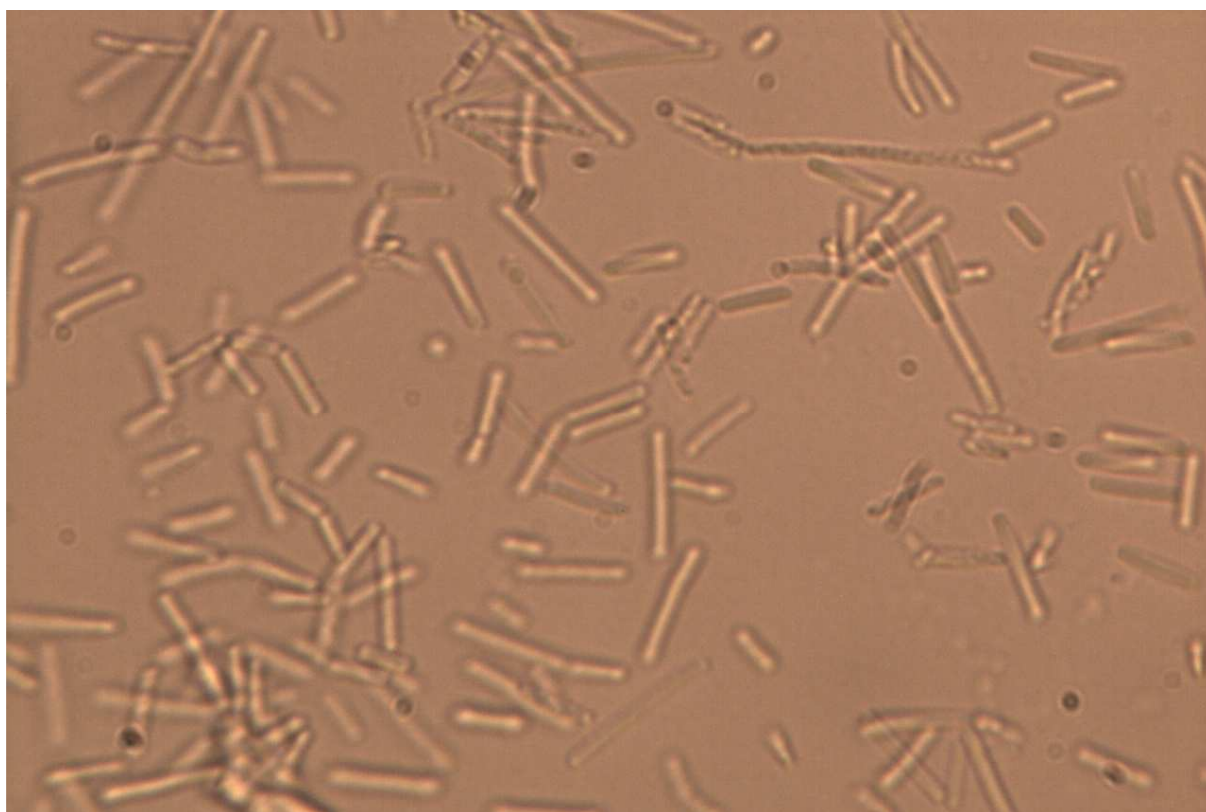
Obr.30: Mikroskopický obraz po kultivaci kontrolního vzorku Lactobacillus 211/06: aerob. kultivace, M.R.S. agar, zvětšení 1000x imerzní objektiv



Obr.31: 1 sada kultivace Lactobacillus 211/06: M.R.S. agar, dole anaerob. a nahoře aerob. kultivace, se zvyšující se koncentrací bakterií (směrem doleva) lze pozorovat změnu barvy, což je patrně způsobené snižováním pH, bakterie vylučují kyselinu mléčnou (od modré ke žluté)



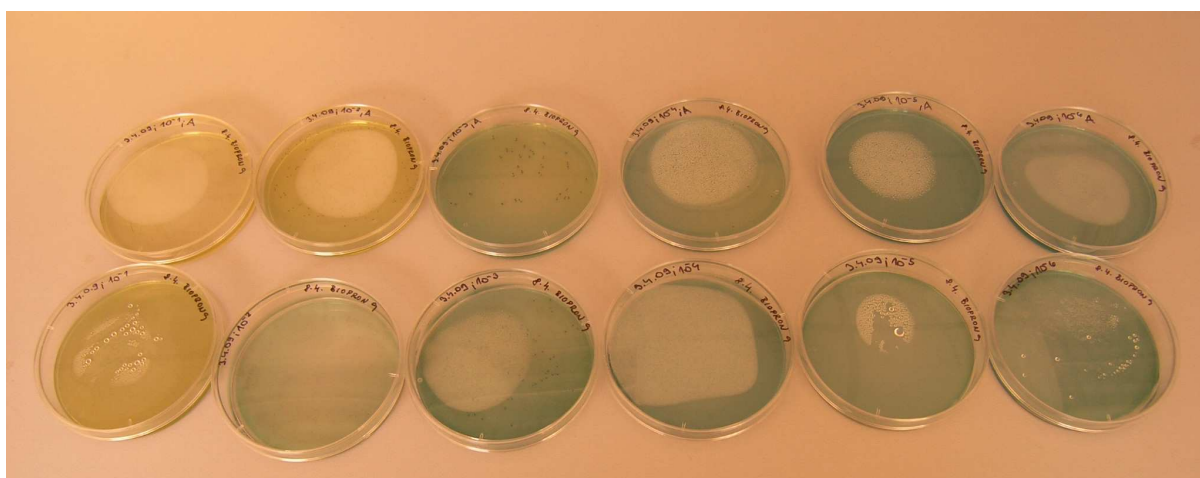
Obr.32: Kultivace vzorku Lacidofil: vlevo ředění 10^{-4} aerobní kultivace, vpravo 10^{-5} anaerob. kultivace, Tomato Juice agar



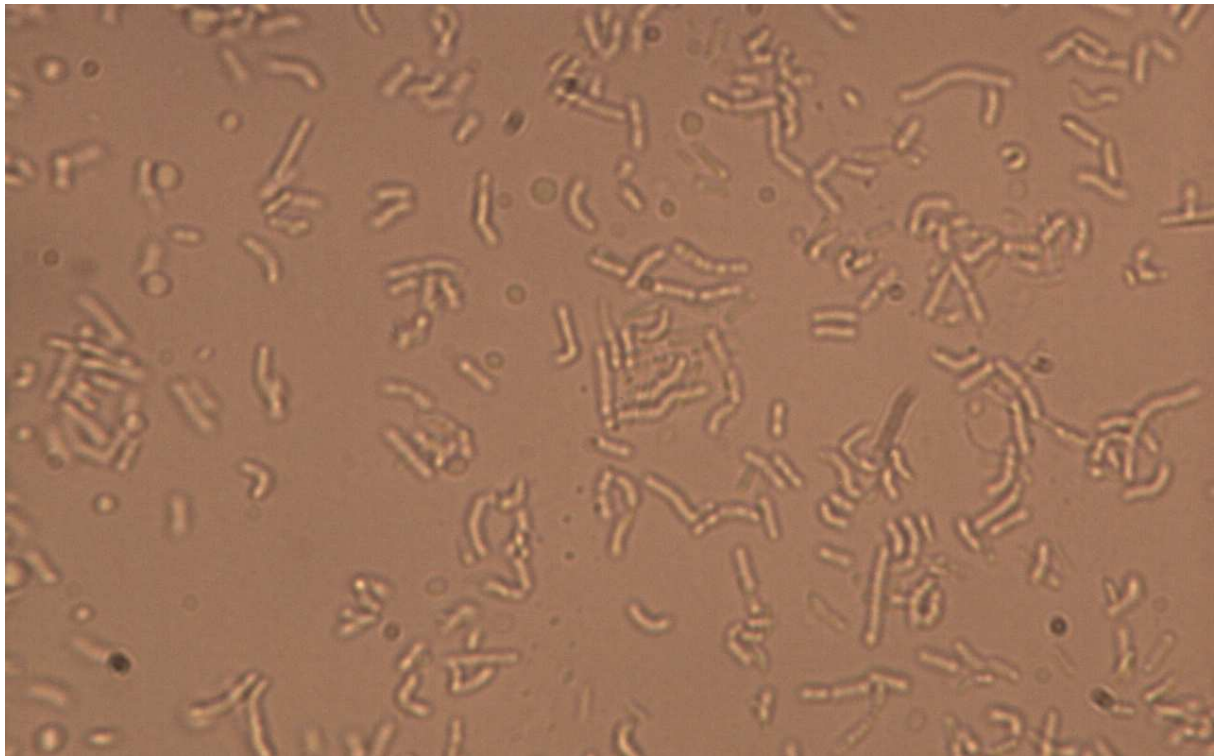
Obr.33: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Lacidofil: ředění 10^{-3} , aerob. kultivace, Tomato Juice agar, zvětšení 1000x imerzní objektiv



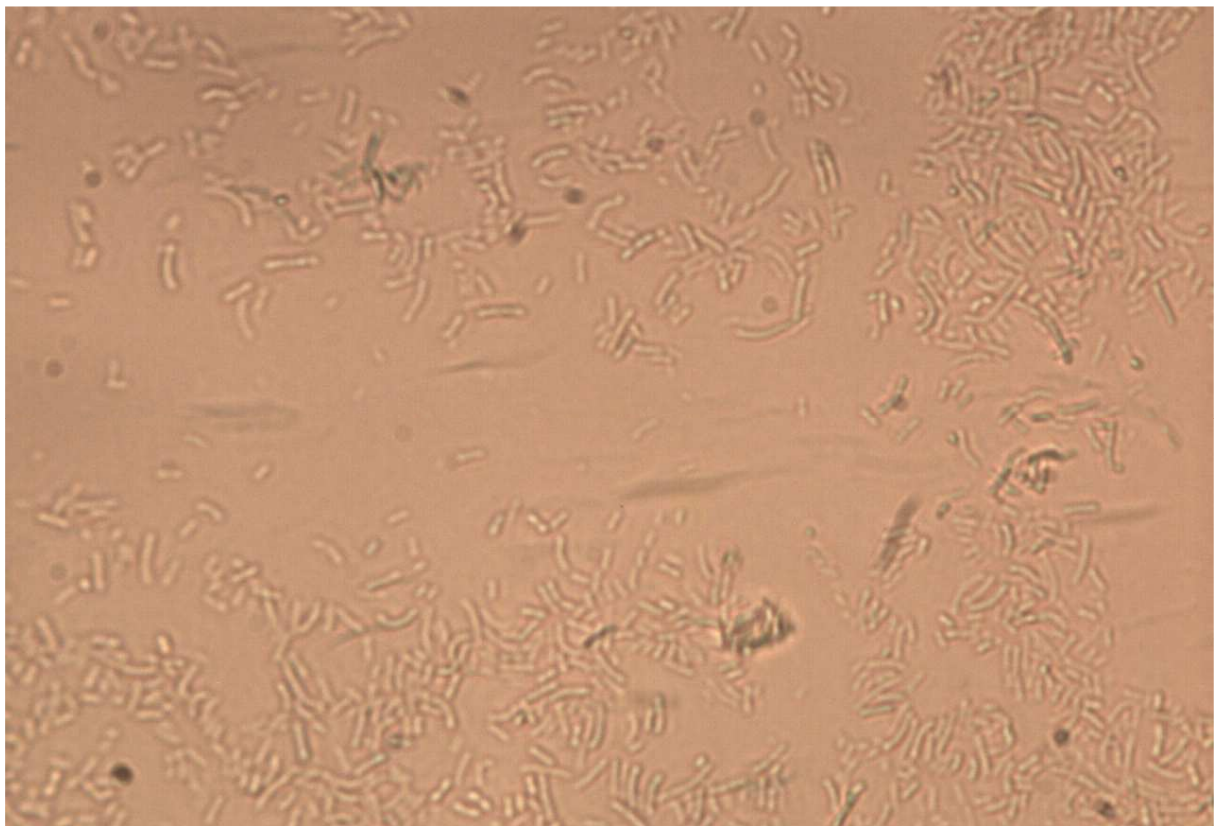
Obr.34: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Lacidofil: ředění 10^{-4} , anaerob. kultivace M.R.S. agar, zvětšení 1000x imerzní objektiv



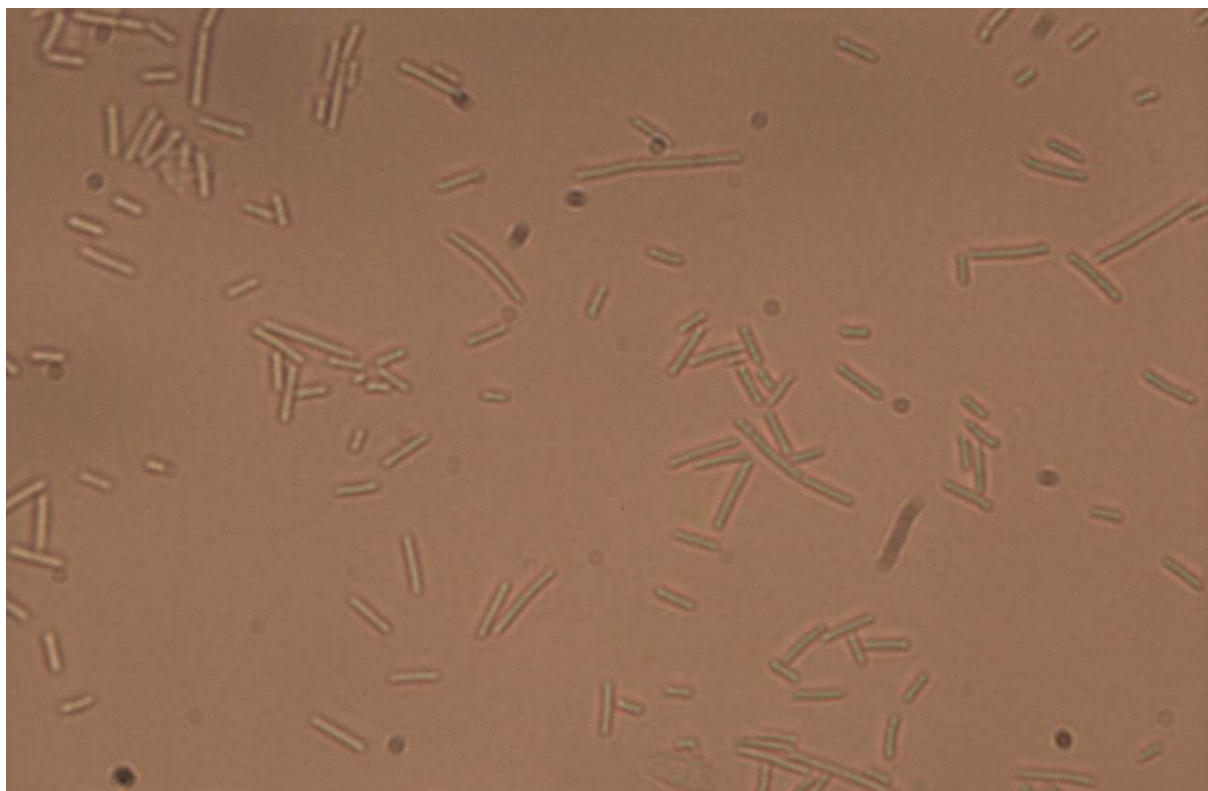
Obr.35: 1 sada kultivace Biopron 9: M.R.S. agar, nahoře anaerob. a dole aerob. kultivace, se zvyšující se koncentrací bakterií (směrem doleva) lze pozorovat změnu barvy, což je patně způsobené snižováním pH, bakterie vylučují kyselinu mléčnou (od modré ke žluté)



Obr.36: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Biopron 9: ředění 10^{-2} , aerob. kultivace, Tomato Juice agar, zvětšení 1000x imerzní objektiv



Obr.37: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Biopron JUNIOR: ředění 10^{-1} , aerob. kultivace M.R.S. agar, zvětšení 600x suchý objektiv



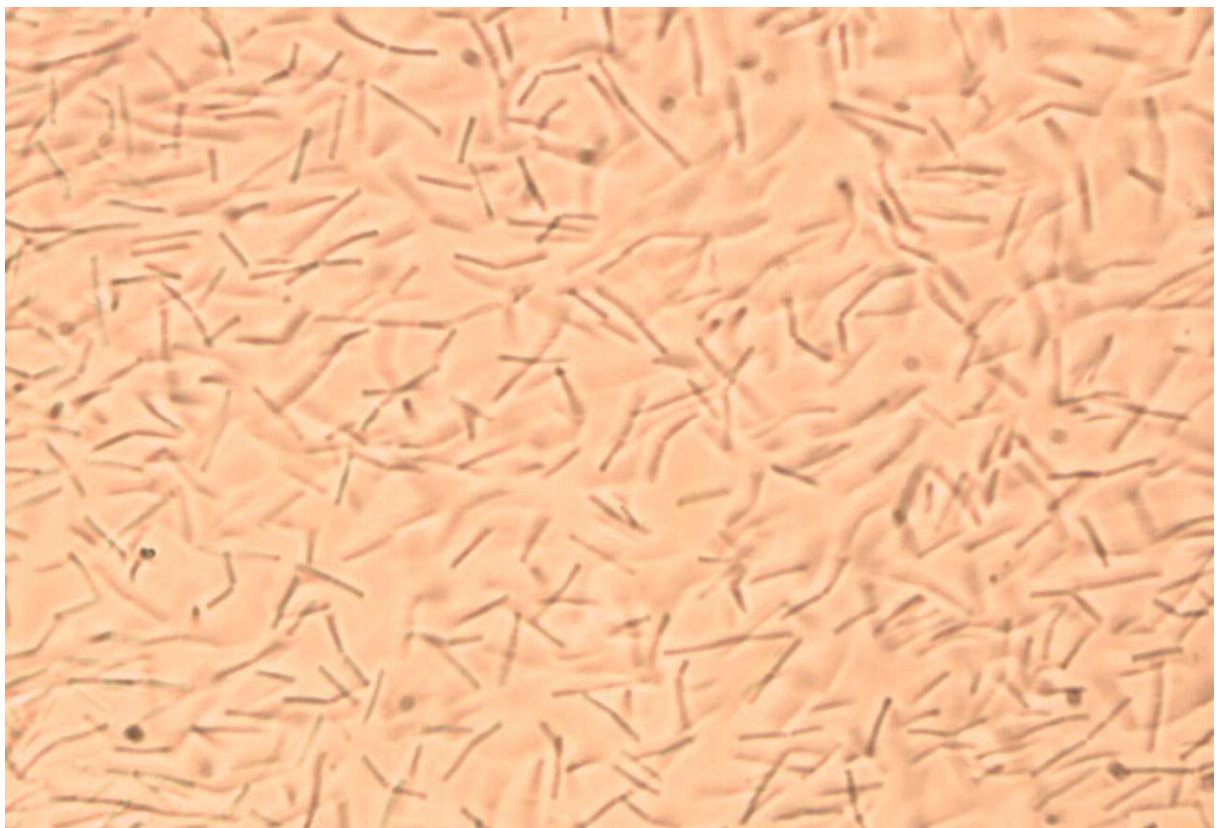
Obr.38: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Biopron JUNIOR: ředění 10^{-6} , aerob. kultivace, Tomato Juice agar, zvětšení 600x suchý objektiv



Obr.39: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Probian mimi: ředění 10^{-3} , aerob. kultivace, Tomato Juice agar, zvětšení 1000x imerzní objektiv



Obr.40: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Nutrolin-B: ředění 10^{-3} , anaerob. kultivace, M.R.S. agar, zvětšení 600x suchý objektiv



Obr.41: Mikroskopický obraz po kultivaci výrobku Nutrolin-B: ředění 10^{-2} , anaerob. kultivace, Tomato Juice agar, zvětšení 600x suchý objektiv